



**Odete do Carmo
Queirós Gonçalves**

**Pesquisa de compostos terpénicos do bagaço de
Vitis vinifera L.. Estabelecimento de bases químicas
e biológicas para o desenvolvimento de estratégias
conducentes à sua valorização como produto de
valor acrescentado.**



**Odete do Carmo
Queirós Gonçalves**

**Pesquisa de compostos terpénicos do bagaço de
Vitis vinifera L.. Estabelecimento de bases químicas
e biológicas para o desenvolvimento de estratégias
conducentes à sua valorização como produto de
valor acrescentado.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico aos meus pais e irmãs.

o júri

presidente

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro (Co-orientador)

Prof. Doutora Maria Rosário Bronze
professor a auxiliar da Universidade da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
professor a auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientadora)

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Sílvia M. Rocha e ao Professor Doutor Manuel António Coimbra, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química por toda a ajuda prestada e simpatia.

À Ruth Pereira investigadora do CESAM do Departamento de Biologia, pelos conhecimentos e apoio com o teste de Ames.

A todas as colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia, em especial à Sónia Ferreira e à Tânia Caetano por toda a dedicação, simpatia, disponibilidade e apoio.

À professora Sónia Mendo, professora auxiliar do Departamento de Biologia pela orientação, disponibilidade e ajuda prestada.

Aos meus colegas e amigos de curso e mestrado do Departamento de Química pela amizade e companheirismo.

À minha família, pelo apoio, carinho e dedicação.

Obrigada.

palavras-chave

Bagaço de uva, microextração em fase sólida em modo de espaço-de-cabeça (HS-SPME), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), sesquiterpenóides, *Vitis vinifera* L., toxicidade, actividade antimicrobiana.

resumo

O bagaço de uva é o resíduo final resultante da prensagem das uvas durante o processo de vinificação. Anualmente, produzem-se cerca de 10 milhões de toneladas a nível mundial deste subproduto, a maioria é descartado com um desperdício. Nesta perspectiva, este trabalho pretende contribuir para a valorização do bagaço de uva como produto de valor acrescentado, através da caracterização da composição volátil do bagaço e do respectivo destilado, com enfoque nos compostos sesquiterpénicos e na avaliação da sua potencial toxicidade e efeito na susceptibilidade bacteriana a antibióticos.

Inicialmente, foi desenvolvida uma metodologia para a caracterização da fracção volátil do bagaço e do seu destilado com recurso à microextração em fase sólida no modo espaço-de-cabeça, acoplada à cromatografia de fase gasosa e espectrometria de massa (HS-SPME/GC-MS). Foi, também, avaliada a toxicidade e mutagenicidade de dez padrões puros de sesquiterpenóides, recorrendo ao teste de Ames e também o efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* e da *Escherichia coli* a antibióticos, usando o método de difusão em placa de agar. Deste estudo, verificou-se que a fase estacionária de PDMS/CAR/DVB foi a que apresentou maior eficiência extractiva, nomeadamente, na extração dos sesquiterpenóides. O *cis*-nerolidol, o valenceno, o guaiazuleno e o *trans*-cariofileno, num intervalo de massas não tóxicas, mostraram-se promissores no aumento da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos, quando testados contra *Staphylococcus aureus*. A *Escherichia coli* apresentou maior susceptibilidade aos antibióticos quando na presença do nerolidol, α -bisabolol e valenceno.

keywords

Pomace, headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), sesquiterpenoids, *Vitis vinifera* L., toxicity, antimicrobial activity.

abstract

Pomace is the final residue obtained from the pressing of grapes during the winemaking process. Annually, ten million tons in world of this by-product are produce as wasted. This work intends to contribute to the valorization of pomace, through the characterization of its volatile composition and the respective distillate. Especial focus was done on sesquiterpenic compounds. Furthermore, potential toxicity and synergistic effect of these compounds in bacterial susceptibility to antibiotics were also evaluated.

Firstly, it was developed a methodology based on headspace- solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) to characterize the volatile composition of pomace and respective destilate. Toxicity and mutagenicity of ten sesquiterpenic standards were evaluated using Ames test. Also, the effect of sesquiterpenic addition on the susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics was study by agar diffusion.

PDMS/CAR/DVB SPME coating fiber showed the higher extraction efficiency, especially to sesquiterpenic compounds. *cis*-Nerolidol, valencene guaiazulene and *trans*-caryophyllene, in a non-toxic mass range, seems to increase *Staphylococcus aureus* susceptibility to antibiotics. *Escherichia coli* showed greater susceptibility to antibiotics in the presence of nerolidol, α -bisabolol and valencene.

ÍNDICES

Índice geral

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BAGAÇO DE UVA	3
1.2. TERPENOS	4
1.2.1. Sesquiterpenóides e <i>Vitis vinifera</i> L.	4
1.2.1.1. Actividade biológica	8
1.3. METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS	8
1.3.1. Microextração em Fase Sólida (SPME)	8
1.3.1.1. Descrição geral de um sistema de SPME	9
1.3.1.2. Etapas de manipulação da técnica de SPME	10
1.3.1.3. Parâmetros experimentais que influenciam a eficiência da técnica de SPME	11
1.3.2. Cromatografia de Gás acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).....	14
1.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DOS SESQUITERPENÓIDES	16
1.5. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	17
1.6. OBJECTIVOS.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO VOLÁTIL DO BAGAÇO DE <i>Vitis vinifera</i> L. E DO RESPECTIVO DESTILADO	23
2.1.1. Amostras	23
2.1.2. Reagentes e materiais	23
2.1.3. Metodologia de HS-SPME	23
2.1.3.1. Selecção da fase estacionária de SPME	24
2.1.3.2. Caracterização da fracção volátil do bagaço de <i>Vitis vinifera</i> L. e da fracção volátil do destilado do bagaço	24
2.1.4. Análise por GC-MS	24
2.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DOS COMPOSTOS SESQUITERPÉNICOS	25
2.2.1. Reagentes e materiais	25
2.2.2. Preparação das soluções de sesquiterpenóides	30
2.2.3. Teste de Ames	31
2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE SESQUITERPENÓIDES NA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ALGUNS ANTIBIÓTICOS.....	32
2.3.1. Materiais e Métodos	33

2.3.1.1. Método difusão em placa de agar	33
2.3.2. Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO VOLÁTIL DO BAGAÇO DE <i>VITIS VINIFERA</i> L. E DO RESPECTIVO DESTILADO OBTIDO POR DESTILAÇÃO POR ARRASTAMENTO DE VAPOR.....	37
3.1.1. Selecção da fase estacionária de SPME	37
3.1.2. Caracterização da fracção volátil do bagaço e do respectivo destilado	41
3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DOS COMPOSTOS SESQUITERPÉNICOS.....	48
3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE SESQUITERPENÓIDES NA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS.....	58
4. CONCLUSÃO	69
5. BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS.....	81

Índice de figuras

Figura 1. Esquema simplificado do processo de vinificação.....	3
Figura 2. Unidade básica de formação de terpenos.	4
Figura 3. Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com a fibra exposta (adaptado [31]).	9
Figura 4. Representação esquemática de um dispositivo de SPME. (a) Suporte da fibra de SPME; e (b) Conjunto da fibra e suporte de SPME (adaptado [24, 33]).	9
Figura 5. Representação esquemática da extracção por SPME em modo directo (adaptado [])...	10
Figura 6. Representação esquemática da extracção por SPME em modo espaço-de-cabeça (adaptado [34]).	10
Figura 7. Representação esquemática do processo de dessorção térmica dos analitos [34].	11
Figura 8. Representação esquemática de fenómeno de absorção e adsorção em micro e macro poros (adaptado [24, 37]).	13
Figura 9. Elementos básicos de um sistema GC/MS ligados a um computador [38].	14
Figura 10. Representação esquemática de um cromatógrafo de gás associado a um computador (http://www.linde.com/International/Web/LG/Br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom).	15
Figura 11. Interpretação do tamanho das zonas de inibição do crescimento bacteriano, causadas pelo antibiótico [53].	18
Figura 12. Representação gráfica dos compostos divididos por famílias, identificados por HS-SPME/GC-MS, usando as fases estacionárias de PDMS e de DVB/CAR/PDMS. (A) Número de compostos por família, (B) Área cromatográfica média dos compostos por família.	40
Figura 13. Representação gráfica dos compostos divididos por famílias, identificados por HS-SPME/GC-MS nas amostras de bagaço e do destilado, usando a fibra de DVB/CAR/PDMS. (A) Número de compostos por família, (B) Área cromatográfica média dos compostos por família.	46
Figura 14. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA98 sem activação metabólica (sem S9).	53
Figura 15. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA98 com activação metabólica (com S9).	54

Figura 16. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA100 sem activação metabólica (sem S9).	55
Figura 17. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA 100 com activação metabólica (com S9).	56
Figura 18. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos [65].	65

Índice de tabelas

Tabela 1. Compostos sesquiterpénicos identificados em uvas, vinho, bagaço de uva e engaços da <i>Vitis vinífera</i> L., e respectivas metodologias.	5
Tabela 2. Fibras comerciais utilizadas para SPME.	13
Tabela 3. Classificação e mecanismo de acção dos antibióticos usados neste trabalho (Adaptado [52]).	19
Tabela 4. Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório e identificados na fracção volátil do bagaço e respectivo destilado.	25
Tabela 5. Concentrações das soluções-mãe e de trabalho, correspondentes a cada sesquiterpenóide.	31
Tabela 6. Massa ($\mu\text{g/placa}$) correspondente a 50 μL das respectivas soluções de sesquiterpenóides para as diferentes concentrações.	32
Tabela 7. Médias das áreas obtidas para os compostos voláteis identificados no bagaço por HS-SPME/GC-MS usando duas fases estacionárias: PDMS e DVB/CAR/PDMS.	37
Tabela 8. Média das áreas obtidas para os compostos identificados no bagaço e do destilado, por HS-SPME, usando a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS.	42
Tabela 9. Avaliação da toxicidade dos dez sesquiterpenóides em estudo para a <i>Salmonella typhimurium</i> <i>his</i> ⁻ , para as estirpes TA98 e TA100 sem (-S9) e com (+S9) activação metabólica.	50
Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos para teste de Ames.	57
Tabela 11. Média do diâmetro dos halos de inibição observados para <i>S. aureus</i> no ensaio de difusão em placa de agar.	59
Tabela 12. Média do diâmetro dos halos de inibição observados para <i>E. coli</i> no teste de difusão em placa de agar.	60
Tabela 13. Similaridade estrutural dos compostos sesquiterpénicos e respectivas características estruturais.	64
Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade de <i>S. aureus</i> aos antibióticos.	67
Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade de <i>E. coli</i> aos antibióticos.	68

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Abreviatura	Designação em Inglês	Designação em Português
ADN	Deoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxirribonucleico
AMC	Amoxicillin / Ac. Clavulanic	Amoxicilina/ Ác. clavulânico
CAZ	Ceftazidime	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacin	Ciprofloxacina
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxa	Divenilbenzila/Carboxen/ Polidimetilsiloxano
E	Erythromycin	Eritromicina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	Flame ionization detection	Detector de ionização de chama
GC	Gas chromatography	Cromatografia em fase gasosa
HS	Headspace	Espaço-de-cabeça
IMP	Imipenem	Imipenemo
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Concentração Mínima Inibitória
MS	Mass spectrometry	Espectrometria de massa
P	Penicillin	Penicilina G
PA	Polyacrylate	Poliacrilato
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano
PDMS/CAR	Polydimethylsiloxane/Carboxen	Polidimetilsiloxano/Carboxen
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxane/divinylbenzene	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
SAFE	Solvent assisted flavour evaporation	Evaporação do sabor assistida por solvente
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SDE	Steam distillation-extraction	Extração por destilação a vapor
SPME	Solid phase microextraction	Microextração em fase sólida
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TE	Tetracycline	Tetraciclina
VA	Vancomycin	Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bagaço de uva

A videira (*Vitis vinífera* L.) é uma das fruteiras mais cultivada do mundo [1], podendo o seu fruto ser usado para a produção de vinho (variedades com maior acidez e conteúdo moderado de açúcares), uva passa (variedades com baixa acidez e ricas em açúcares), uva de mesa (variedades com baixa acidez, pobres em açúcares e que cumpram padrões de tamanho, coloração e forma), produção de sumo, confecção de doces e geleia, entre outras [2].

A produção mundial de uvas rondou os 67 milhões de toneladas em 2007 [3], sendo que aproximadamente 80% da quantidade total é usada na produção de vinho, onde se produzem cerca de 10 milhões de toneladas de bagaço de uva em apenas algumas semanas [4].

Os subprodutos agrícolas contêm uma grande variedade de espécies biologicamente activas. Estima-se que 13% do peso das uvas processadas pela indústria vinícola acaba como subproduto [5].

O bagaço de uva é o resíduo resultante da prensagem das uvas no processo de vinificação (Figura 1), sendo constituído basicamente pela grainha, pela película e os pelos engaços das uvas [6, 7]. Este resíduo é aplicado para diversos fins, como por exemplo a obtenção aguardente [8], de etanol, de óleo da grainha da uva, de antocianinas e de tartarato [9]. É ainda usado como adubo para solos e é incorporado em alimentos para animais [1].

As películas e sementes de uva são cada vez mais utilizadas para a obtenção de ingredientes alimentares funcionais, tais como antioxidantes naturais e suplementos alimentares [9]. Contudo, a uva, especialmente a película, é também uma fonte de compostos voláteis/aroma, os quais podem estar presentes na forma livre e, em muito maior quantidade, como compostos não voláteis glicosidicamente ligados. Dos compostos voláteis destacam-se os sesquiterpénicos, os quais têm sido relacionados com a actividade medicinal de diferentes plantas com aplicações na área da saúde, principalmente como anti-inflamatórios, anti-HIV, anti-bacterianos, anti-tumorais [15], etc.

Neste sentido, estes compostos são alvo de interesse, pois reconhece-se neles uma fonte promissora de princípios activos.

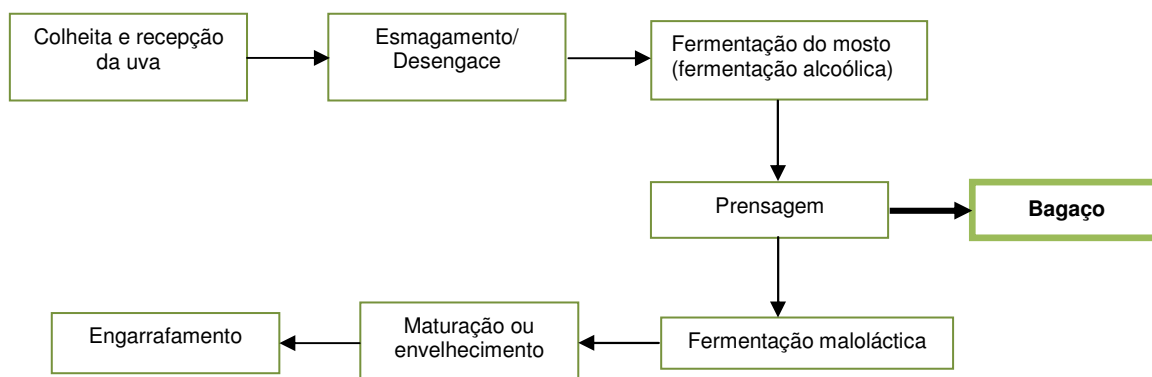
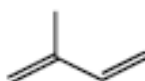


Figura 1. Esquema simplificado do processo de vinificação.

1.2. Terpenos

Os terpenóides com mais de 40.000 compostos descritos [10] constituem uma classe de produtos naturais com grande diversidade estrutural, provenientes de unidades de isopreno com cinco carbonos (C5) (Figura 2). As estruturas típicas contêm esqueletos de carbono representada por (C5)_n, e são classificados de acordo com o número de unidades isoprénicas em: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) [11].



Isopreno

Figura 2. Unidade básica de formação de terpenos.

Nas plantas, os terpenos aparecem como sendo os principais constituintes dos óleos essenciais. São responsáveis pelo odor característico de muitos vegetais, possuindo funções como a protecção do organismo contra predadores e patogénicos, funções antioxidantes e bio-reguladoras.

1.2.1. Sesquiterpenóides e *Vitis vinifera* L.

Os sesquiterpenóides são uma família de produtos naturais isoprenóides em C15, encontrados em plantas superiores, inferiores [12] e frutos, inclusive as uvas de *Vitis vinifera* L., frutos silvestres e citrinos [13]. Nas plantas, desempenham papéis ecológicos nas interações com insectos e microrganismos, actuando como atractivos e como repelentes. Além disso, os sesquiterpenóides são componentes essenciais de muitos óleos essenciais, que são importantes comercialmente para as indústrias do aroma [12].

Os terpenóides são compostos importantes para o aroma das uvas *Vitis vinifera* L., principalmente os monoterpenóides e os sesquiterpenóides. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de sesquiterpenóides identificados em amostras de uvas, de vinho, de bagaço e de engaços de uva de variedades de *Vitis vinifera* L.. Esta, permite observar a diversidade de compostos sesquiterpénicos que é possível identificar nestas variedades.

Desta tabela, é possível constatar que existem sesquiterpenóides que são comuns às diferentes variedades de uvas *Vitis vinifera*, como é o caso do β -bourbureno, presente na Merlot, Cabernet Gernischt, Cabernet Fanc, Cabernet Sauvignon [14] e na Baga [15], e do α -farneseno, α -ilangleno, β -cariofileno, epizonareno e junipeno que estão presentes nas quatro últimas variedades de uva referidas anteriormente.

1. Introdução

Dos sesquiterpenóides identificados nas variedades Nerello Mascavalese, Cabernet Sauvignon, Frappato e Nero d'Avola, o α -ilangleno, 3,7-guaiadieno, aromadendreno, epizareno, δ -cadideno, α -cadideno e germacreno D são os compostos maioritários [17].

O valenceno, apesar de se encontrar em apenas uma variedade de uva, é um dos principais voláteis emitidos a partir de variedades de flores brancas e vermelhas da videira de *Vitis vinifera* L. [16]. Em 2006, Coelho *et al.* [15], verificaram a existência de um perfil sesquiterpénico comum entre uvas maduras da 'Baga' de duas vinhas diferentes (Colégio e Pedralvites), onde os principais sesquiterpenóides identificados foram α -ilangleno (42 e 25%), β -bourboneno (12 e 10%), germacreno D (10 e 12%) e γ -cadineno (7 e 5%).

Embora estes compostos sesquiterpénicos também se encontrem em plantas e frutos, o elevado número de compostos identificados nas uvas e subprodutos de *Vitis vinifera* L. sugerem que esta é uma potencial fonte de sesquiterpenóides.

Tabela 1. Compostos sesquiterpénicos identificados em uvas, vinho, bagaço de uva e engaços da *Vitis vinifera* L., e respectivas metodologias.

Composto	Tipo de amostra			Metodologia	Ref. Bibli.
	Vitis vinifera L.				
	Uva	Vinho	Bagaço de uva e engaços		
α-calacoreno	Baga	Baga		HS-SPME/GC-MS	[15] [13]
			Frappato ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
(+) -aromadendreno	Cabernet Gernischt Baga			SAFE/GC-MS/MS HS-SPME/GC-MS	[14]
			Frappato ^c Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
β-bourboneno	Cabernet Gernischt Merlot Cabernet Fanc Cabernet sauvignon Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]
			Nerello Mascalese ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
α-cadideno	Baga			HS-SPME/GC-MS	[15]
			Frappato ^a Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
γ-cadideno	Cabernet Gernischt, Baga			SAFE/GC-MS/MS HS-SPME/GC-MS	[14] [15]
			Frappato ^c Nerello Mascalese ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
α-copaeno	Merlot			SAFE/GC-MS/MS	[14]
			Nerello Mascalese ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
germacreno D	Cabernet Gernischt Cabernet Fanc Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]

1. Introdução

Composto	Tipo de amostra			Metodologia	Ref. Bibli.
	Vitis vinifera L.				
	Uva	Vinho	Bagaço de uva e engaços		
			Frappato ^a Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a		
α-ilangleno	Cabernet Gernischt Cabernet Fanc Cabernet Sauvignon Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]
			Frappato ^c Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
γ-muroleno	Cabernet Gernischt			SAFE/GC-MS/MS	[14]
			Frappato ^b Nerello Mascalese ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
δ-selineno	Baga			HS-SPME/GC-MS	[15]
			Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
3,7-guaiadiene	Baga			HS-SPME/GC-MS	[15]
			Frappato ^c Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
epizonareno	Cabernet Gernischt Merlot Cabernet Sauvignon Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]
			Frappato ^a Nero d'Avola ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
ciclosativeno	Baga			HS-SPME/GC-MS	[15]
			Frappato ^a Nero d'Avola ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
α-muroleno	Baga	Baga		HS-SPME/GC-MS	[15] [13]
nerolidol		Sercial Verdelho Boal Malvasia Tinta Negra		HS-SPME/GC-MS	[18]
			Nerello Mascalese ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]
(-)-isoledeno	Cabernet Gernischt Merlot Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]
junipeno	Cabernet Gernischt Merlot Cabernet Fanc Cabernet Sauvignon			SAFE/GC-MS/MS	[14]
β-cariofileno	Cabernet Gernischt Cabernet Fanc Cabernet Sauvignon Baga			SAFE/GC-MS/MS	[14]
				HS-SPME/GC-MS	[15]
α-humuleno	Cabernet Gernischt			SAFE/GC-MS/MS	[14]
valenceno	Cabernet Gernischt			SAFE/GC-MS/MS	[14]
α-farneseno	Cabernet Gernischt Merlot			SAFE/GC	[14]

1. Introdução

Composto	Tipo de amostra			Metodologia	Ref. Bibli.
	Vitis vinifera L.				
	Uva	Vinho	Bagaço de uva e engaços		
	Cabernet Fanc Cabernet Sauvignon				
β-cubebeno	Cabernet Gernischt Baga			SAFE/GC-MS/MS HS-SPME/GC-MS	[14] [15]
β-cadideno	Baga			HS-SPME/GC-MS	[15]
δ-cadideno	Cabernet Gernischt Merlot			SAFE/GC-MS/MS	[14]
α-amorfenol	Cabernet Gernischt Baga			SAFE/GC-MS/MS HS-SPME/GC-MS	[14] [15]
γ-eudesmol		Sercial Verdelho Boal Malvasia Tinta Negra		HS-SPME/GC-MS	[18]
τ-muurolol α-cadinol		Sercial Verdelho Boal Malvasia Tinta Negra		HS-SPME/GC-MS	[18]
farnesol		Sercial Verdelho Boal Malvasia		HS-SPME/GC-MS	[18]
caladeno calareno α-camigreno α-cedreno		Baga		HS-SPME/GC-MS	[13]
δ-cadinol			Frappato ^a Nerello Mascalese ^a Cabernet Sauvignon ^a	SDE/GC–FID e GC-MS	[17]

^a - Presente nos engaços de uva;

^b - Presente no bagaço de uva;

^c - Presente nos engaços e no bagaço de uva.

Dos exemplos de trabalhos referenciados na Tabela 1, envolvendo a identificação dos compostos voláteis e semi-voláteis das variedades de *Vitis vinifera*, observa-se que foram aplicadas diferentes técnicas de extracção/concentração e diferentes métodos de separação e identificação.

A extracção por destilação a vapor (SDE) combinada com a cromatografia de gás - espectrometria de massa (GC-MS) ou com cromatografia de gás - detector de ionização de chama foi aplicada para as variedades Frappato, Nerello Mascalese, Nero d'Avola e Cabernet Sauvignon, tendo sido identificados um total de 16 sesquiterpenóides. Por outro lado, a extracção do aroma assistida por solvente (SAFE) foi combinada com a cromatografia de gás - espectrometria de massa (GC-MS/MS) com um total de 15 sesquiterpenóides identificados nas variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt, Cabernet Fanc e Merlot.

Por último, com a microextracção em fase sólida em modo espaço-de-cabeça (HS-SPME) combinada com cromatografia de gás - espectrometria de massa (GC-MS), foram identificados 26 sesquiterpenóides, nas variedades Sercial, Verdelho, Boal, Malvasia, Tinta Negra e Baga (nas três amostras).

Daqui, constata-se que dada a eficiência extractiva da HS-SPME/GC-MS, esta técnica é uma opção para a extracção de compostos sesquiterpénicos. Para além disso, a técnica de SPME tem como vantagens o facto de ser uma técnica livre de solventes, simples e rápida.

1.2.1.1. Actividade biológica

Até ao momento, não foi realizado nenhum estudo abrangendo a actividade biológica dos sesquiterpenóides extraídos a partir de uvas e vinhos de *Vitis vinifera* L.. No entanto, parece adequado expor a actividade biológica dos sesquiterpenóides identificados em plantas e frutos, comuns aqueles identificados nas uvas e vinho de *Vitis vinifera* L..

Da actividade biológica dos sesquiterpenóides incluir-se a actividade antifúngica [19], actividade antimicrobiana [20, 21], anti-tumoral [20] e anti-HIV [13].

Os sesquiterpenóides como o farnesol, α -bisabolol, nerolidol, guaiazuleno e o germacreno D, mostraram ter a capacidade de aumentar a permeabilidade bacteriana e a susceptibilidade a compostos antimicrobianos exógenos. Esses compostos aumentam a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a antibióticos, por perturbar o normal funcionamento da barreira da membrana da célula bacteriana, permitindo a penetração na célula de solutos exógenos, como os antibióticos. Este efeito é mais pronunciado para bactérias Gram positivo, provavelmente devido à falta de barreiras de permeabilidade adicionais, nomeadamente a membrana externa de bactérias Gram negativo [13, 22].

A actividade antioxidante de óleos essenciais de *Teucrium orientale* L., parece estar relacionada com a quantidade do sesquiterpeno β -cariofileno, ou seja, quanto maior for a actividade antioxidante dos óleos, maior é a quantidade de β -cariofileno. Além disso, a fase de vapor da destilação do petróleo vegetativo das plantas contém uma menor quantidade de β -cariofileno, comparativamente com os óleos em estágio avançado de maturação, não apresentam actividade antioxidante. Isto sugere que a actividade antioxidante ocorrer principalmente devido à presença de β -cariofileno no óleo [13].

1.3. Metodologia para análise de compostos voláteis e semi-voláteis

1.3.1. Microextracção em Fase Sólida (SPME)

A microextracção em fase sólida surgiu da necessidade de se desenvolver uma técnica de extracção e concentração, capaz de simplificar a etapa de preparação das amostras, diminuir o tempo envolvido nas análises [23, 24] e livre de solventes [25]. As principais vantagens desta técnica são a simplicidade de manuseamento, custo reduzido, sensibilidade e selectividade [26]. Para além disso, possibilita a caracterização do espaço-de-cabeça das amostras, fornecendo um extracto representativo dos compostos com afinidade para a fase estacionária que são

responsáveis pelo aroma detectado pelo sistema olfativo [27], e a extracção a baixa temperatura evitando a formação artefactos durante a análise da amostra [26].

O principal componente de um dispositivo de SPME consiste numa fibra de sílica fundida, revestida no exterior com uma fase estacionária [26] que pode ser sólida, líquida ou mista, sendo posta em contacto com a amostra (sistema de duas fases) ou introduzida no seu espaço-de-cabeça (sistema de três fases) [28].

1.3.1.1. Descrição geral de um sistema de SPME

O dispositivo de SPME consiste em: i) uma agulha de aço-inox (Figura 3), que tem como objectivos proteger a fibra e perfurar os septos, e ii) num suporte (Figura 4) com um êmbolo que permite guiar a fibra para dentro e para fora da agulha [29, 30].

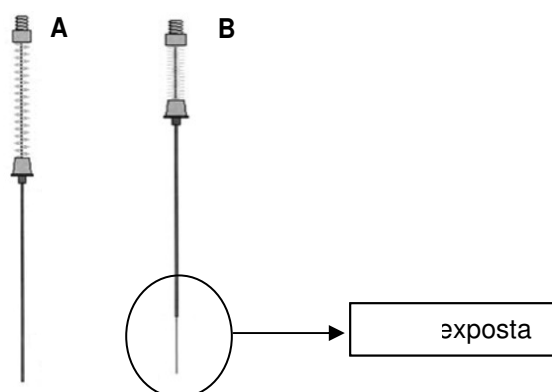


Figura 3. Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com a fibra exposta (adaptado [31]).

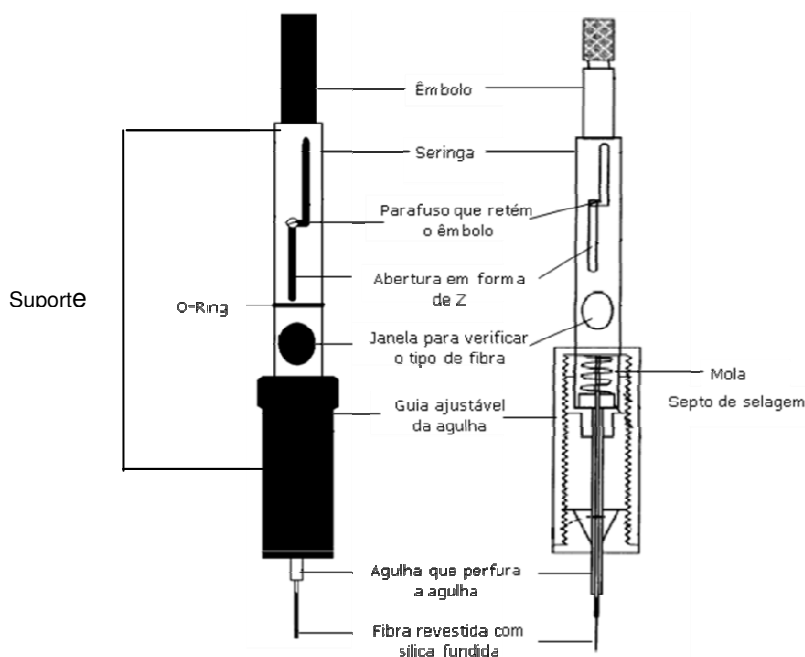


Figura 4. Representação esquemática de um dispositivo de SPME. (a) Suporte da fibra de SPME; e (b) Conjunto da fibra e suporte de SPME (adaptado [24, 33]).

1.3.1.2. Etapas de manipulação da técnica de SPME

A técnica de SPME envolve duas etapas de manipulação [29, 32]:

1º. Extracção ou sorção dos analitos. Existem dois modos básicos de extracção dos analitos, que podem ser usados em SPME: extracção em modo directo e extracção em modo espaço-de-cabeça.

Na extracção em modo directo (Figura 5), a fase estacionária é inserida na amostra líquida, onde os analitos são extraídos directamente da matriz da amostra. Por outro lado, no modo em espaço-de-cabeça (Figura 6), os analitos têm de ser transportados através da matriz da amostra antes de poderem atingir a fase estacionária [24, 33]. Este modo de extracção pode ser aplicado a amostras sólidas, líquidas e gasosas.

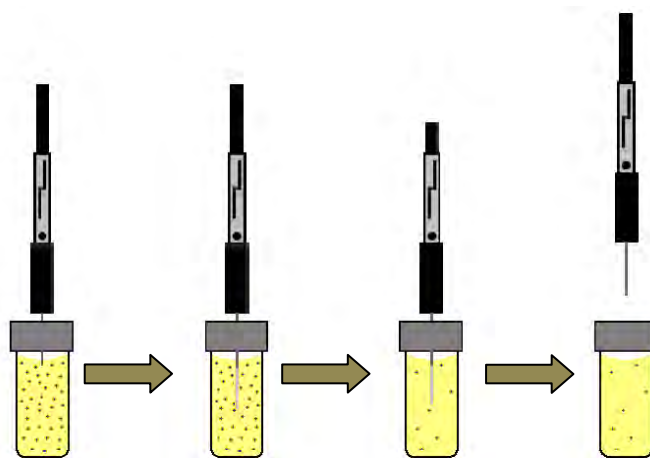


Figura 5. Representação esquemática da extracção por SPME em modo directo (adaptado [34]).

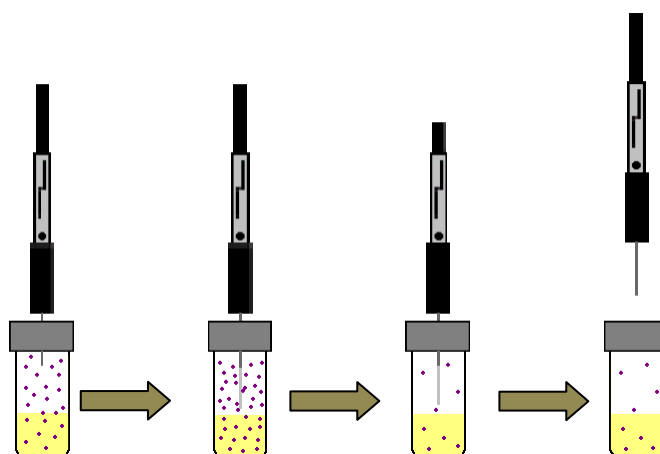


Figura 6. Representação esquemática da extracção por SPME em modo espaço-de-cabeça (adaptado [34]).

2º. Dessorção térmica dos analitos (Figura 7). Esta etapa consiste na dessorção do analito sorvido na etapa anterior por mecanismo de absorção ou adsorção.

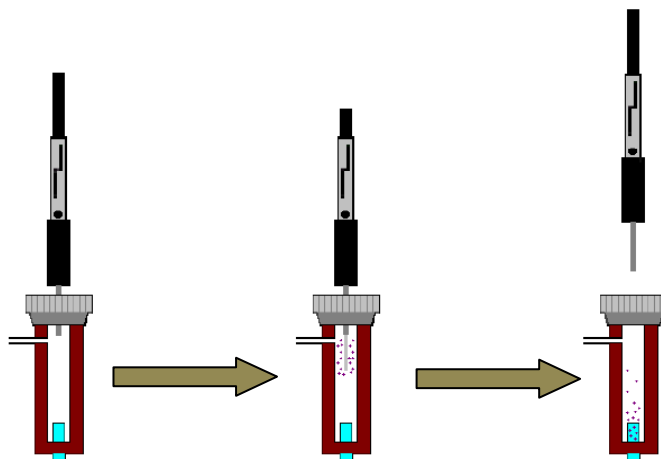


Figura 7. Representação esquemática do processo de dessorção térmica dos analitos [34].

Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de SPME com a amostra é perfurado e a fibra é então exposta à amostra. Terminado o tempo de extracção, a fibra é novamente retraída para o interior da agulha sendo esta retirada do septo.

Com a agulha retraída perfura-se o septo do injectore, a fibra é exposta e ocorre dessorção térmica. Terminada esta fase recolhe-se novamente a fibra e retira-se a agulha [29].

1.3.1.3. Parâmetros experimentais que influenciam a eficiência da técnica de SPME

A eficiência extractiva da técnica de SPME é influenciada por vários parâmetros experimentais, tais como, o efeito da agitação, temperatura, volume de amostra, adição de um sal e a fase estacionária.

A agitação da amostra diminui o tempo necessário para se atingir o equilíbrio, uma vez que a difusão dos analitos ao redor da fibra aumenta [35]. Por outro lado, favorece o aumento da reprodutibilidade das análises ao eliminar as variações provocadas por uma eventual heterogeneidade da matriz [27].

No efeito temperatura, há o aquecimento da amostra que fornece energia ao sistema e permite que as moléculas dos analitos ultrapassem as barreiras energéticas que os prendem à matriz [27, 28]. A temperatura tem ainda um efeito determinante no aumento da pressão de vapor dos analitos da fase aquosa para o espaço-de-cabeça, tornando o processo de transferência de massa mais eficiente [24].

O efeito volume de amostra em SPME está directamente relacionado com a sensibilidade do método. A razão do volume do espaço-de-cabeça/volume de amostra (β) é a razão entre o volume de gás e o volume de amostra, a qual pressupõe a existência de um espaço suficiente para que os compostos possam volatilizar para o espaço-de-cabeça, de forma a atingir o equilíbrio entre as fases para que haja uma boa sorção dos compostos à fibra [28].

O efeito da adição de sal, geralmente de cloreto de sódio ou sulfato de sódio, permite melhorar a eficiência de extracção através do aumento da força iónica da solução, diminuindo drasticamente a solubilidade dos analitos na matriz da amostra, resultando no aumento do coeficiente de distribuição e consequentemente numa maior apetência dos mesmos para o revestimento da fibra [35, 27].

- **Fase estacionária**

A escolha da fase estacionária é um factor importante na optimização da SPME. As fases estacionárias da SPME podem apresentar diferentes tipos de composição, a qual é seleccionada de acordo com o tipo de compostos que se pretende analisar. A composição do revestimento da fibra de SPME vai condicionar o modo de extracção dos compostos.

O modo de extracção dos revestimentos polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA) baseia-se no mecanismo de absorção. O revestimento PDMS é líquido, e o revestimento de PA é sólido cristalino, tornando-se líquido com o aumento da temperatura. Os restantes revestimentos são do tipo combinado, líquidos com partículas porosas, sendo o seu processo extractivo baseado no mecanismo de adsorção [37].

A Tabela 2 apresenta os diferentes tipos de revestimentos e respectivas espessuras, que podem variar entre 7 e 100 μm , e o modo de interacção com os compostos voláteis e as possíveis aplicações.

Os revestimentos das fibras diferem na polaridade e na espessura do filme. As fibras polares são eficazes na extracção de analitos polares, e as fibras não polares são eficazes na extracção de analitos não polares a partir de diferentes matrizes [36].

De acordo com a polaridade, as fibras de SPME podem ser ordenadas por ordem crescente da seguinte forma: PDMS < CAR/PDMS < DVB/CAR/PDMS < PA < PDMS/DVB. As fibras de SPME com revestimentos mais espessos requerem mais tempo para atingir o equilíbrio, mas proporcionam maior sensibilidade devido à grande quantidade de analitos que podem ser extraídos. As fibras em SPME apresentam como vantagem, o facto de poderem ser reutilizadas inúmeras vezes, dependendo no entanto, do tipo de aplicação a que são sujeitas, nomeadamente, a complexidade da matriz da amostra, as condições experimentais e os cuidados no manuseamento [28].

1. Introdução

Tabela 2. Fibras comerciais utilizadas para SPME.

Tipo de revestimento	Espessura do filme	Tipo de interacção	Aplicação
PDMS	100 µm 30 µm 7 µm	Absorção	Compostos orgânicos apolares, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PDMS/DVB	60 µm 65 µm	Mista	Compostos voláteis, aminas, compostos nitroaromaticos
CAR/PDMS	75 µm 85 µm	Adsorção	Compostos de baixo peso molecular e gases
PA	85 µm	Absorção	Compostos polares semi-voláteis
DVB/CAR/PDMS	30 µm 50 µm	Adsorção	Compostos voláteis e semi-voláteis

PDMS: poldimetilsiloxano; PA: poliacrilato; DVB: divinilbenzeno; CW: carbowax; CAR:carboxen.

A interacção entre a fase estacionária e os compostos extraídos da amostra pode ser por absorção, por adsorção ou mista (Figura 8). A fase estacionária do tipo absorvente funciona como uma esponja, em que os analitos da amostra são retidos no seu interior. Na fase estacionária do tipo adsorvente, os analitos são retidos à superfície. Esta pode apresentar micro (2-20 Å), meso (20-500 Å) e macro poros (> 500 Å). Neste tipo de revestimento existe um número mais limitado de locais de sorção do que nas do tipo absorventes, o que pode provocar competição entre os analitos. Para concentrações de analito muito elevadas nas fases estacionárias do tipo adsorventes, ocorrem fenómenos de saturação e consequentemente a competição entre os analitos. Para concentrações muito baixas de analito a resposta é linear. As fases estacionárias do tipo absorvente apresentam gamas de linearidade cerca de quatro vezes superiores às do tipo adsorvente. Por sua vez, a interacção por adsorção permite uma maior sensibilidade [37].

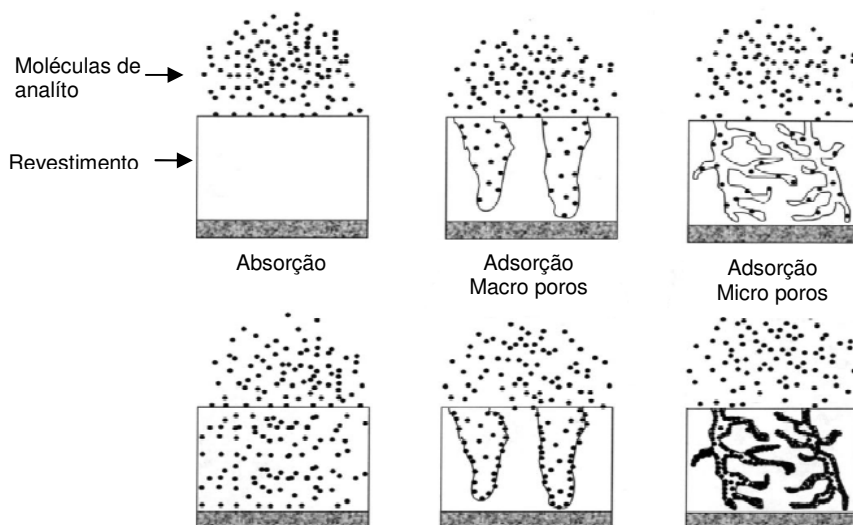


Figura 8. Representação esquemática de fenómeno de absorção e adsorção em micro e macro poros (adaptado [24, 37]).

1.3.2. Cromatografia de Gás acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

Quando um cromatógrafo de gás e um espectrómetro de massa são combinados em directo no sistema GC-MS, o aumento das suas capacidades analíticas é exponencial [38].

O sistema de GC-MS gera uma grande quantidade de informação num único ensaio, sendo a sua aquisição e o controle de dados computadorizados [39]. Assim, com o computador a operar, as várias técnicas de manipulação de dados tornaram possível melhorar a qualidade dos dados analíticos. Os elementos básicos de um sistema de GC-MS ligados a um computador estão indicados na Figura 9.

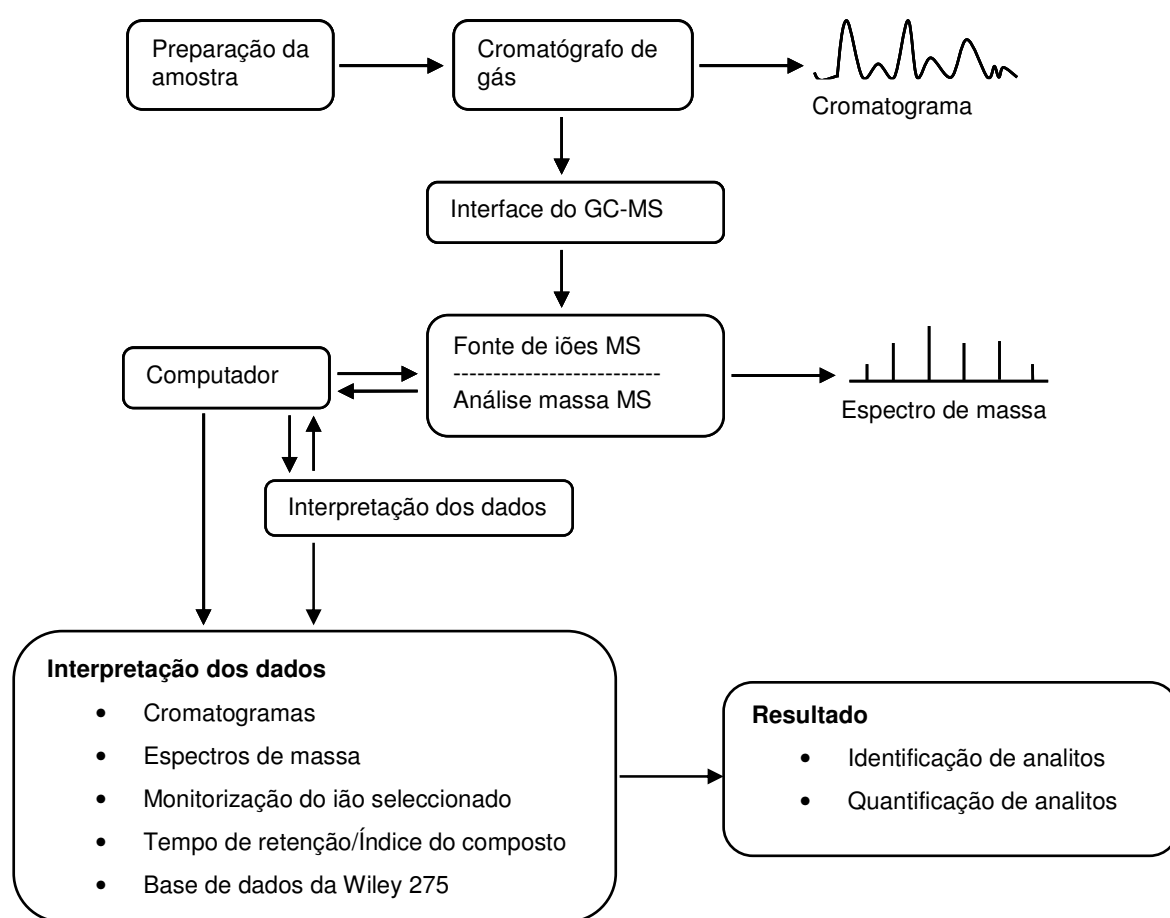


Figura 9. Elementos básicos de um sistema GC/MS ligados a um computador [38].

A cromatografia em fase gasosa tem como função separar os componentes de uma mistura fazendo-os mover um gás sobre uma fase estacionária [39]. Este instrumento fornece o tempo de retenção de cada componente [40].

A Figura 10 mostra de forma esquemática, um cromatógrafo de gás onde uma amostra líquida volátil ou gasosa é injectada no injector, vaporizando rapidamente. O vapor é arrastado através da coluna por meio de um gás de arraste (He , N_2 ou H_2), e os analitos da mistura são separados chegando ao detector. A coluna deve estar suficientemente quente, para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição dos analitos num tempo razoável. O detector é mantido a uma temperatura superior à da coluna, para que todos os analitos permaneçam na forma gasosa [39].

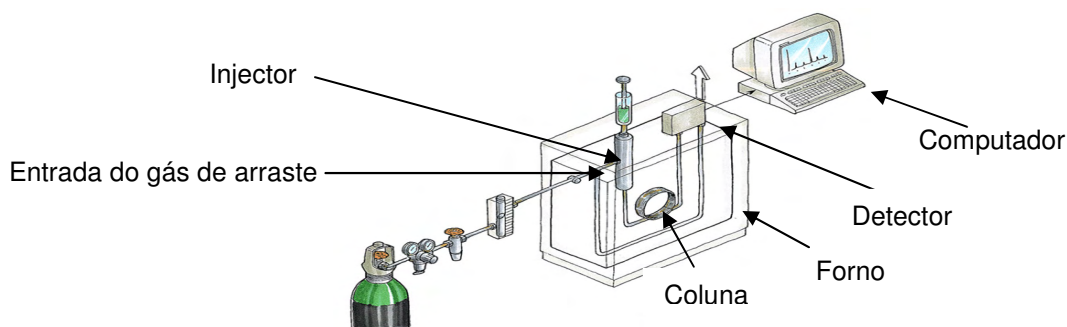


Figura 10. Representação esquemática de um cromatógrafo de gás associado a um computador (http://www.linde.com/International/Web/LG/Br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom).

A separação dos componentes de uma mistura é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária. Um componente com pouca afinidade para a fase estacionária elui rapidamente. Ao chegarem ao espectrómetro de massa do tipo quadrupolo as moléculas são ionizadas sob vácuo, formando-se um grupo de iões com diferentes razões massa/carga (m/z) que são separados pela interacção de campos eléctricos e posteriormente detectados. O espectrómetro de massa do tipo quadrupolo mede a razão m/z de iões em fase gasosa e a sua abundância [28].

Cada composto apresenta uma fragmentação característica que, para um mesmo tipo de detector, só depende da energia dos electrões ionizantes e da temperatura a que ocorre a ionização. Dos cromatogramas que se obtêm é possível retirar informação qualitativa, que está relacionada com o tempo de retenção característico de cada componente, e informação quantitativa referente às áreas cromatográficas dos picos [28].

A cada ponto do cromatograma está associado um espectro de massa. Neste é estabelecida a relação entre a razão m/z dos iões detectados e a abundância de cada espécie iónica. A intensidade relativa (abundância) dos iões observados no espectro de massa de um composto puro, pode variar de instrumento para instrumento. Instrumentos devidamente calibrados apresentarão todos os mesmos iões aos mesmos valores de m/z [30].

1.4. Avaliação da toxicidade e mutagenicidade dos sesquiterpenóides

A toxicidade consiste na capacidade de uma substância química produzir um efeito nocivo quando interage com um organismo vivo. Os efeitos tóxicos dos compostos exógenos muitas vezes não resultam da substância-mãe, por si só, mas de metabolitos reactivos formados dentro da célula. Esta biotransformação de produtos químicos, relativamente inertes, em metabolitos altamente reactivos é referida geralmente como activação metabólica, essencial para a toxicidade quimicamente induzida [41]. Os compostos com efeitos mutagénicos são aqueles que podem induzir mutações no ADN [52].

O teste de Ames ou teste da mutação reversa consiste num método rápido e simples *in vitro*, usado para avaliar a mutagenicidade de compostos químicos e de misturas complexas ambientais ou biológicas [42, 43, 44]. Este teste, deve o seu nome ao seu criador Bruce Ames, tendo sido desenvolvido especificamente para detectar a mutagénese induzida quimicamente usando a bactéria *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). O seu desenvolvimento, dependeu essencialmente dos avanços científicos na compreensão do papel de químicos mutagénicos no desenvolvimento de cancros em animais [45, 46, 47].

O teste de Ames baseia-se na observação de que a exposição de estirpes mutantes de *S. typhimurium* (células His⁻, incapazes de sintetizar histidina) ou de *Escherichia coli* (células Try⁻, incapazes de sintetizar triptofano) a substâncias mutagénicas podem induzir novas mutações que revertem as mutações existentes nas estirpes testadas, que readquirem a capacidade funcional para sintetizar o aminoácido essencial. As bactérias com mutação reversa são detectadas pela sua capacidade de crescer em meios com concentrações vestigiais do aminoácido requerido pela estirpe testada [44, 45, 48].

Os testes realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica [48], uma vez que muitos químicos mutagénicos/carcinogénicos requerem activação metabólica para exercer os seus efeitos biológicos [43]. Esta função é desempenhada pelo citocromo P450, localizado essencialmente no fígado. A fim de se poderem extrapolar os resultados dos testes com *S. typhimurium* para mamíferos e seres humanos, torna-se necessário realizar os testes na presença de extracto de fígado de rato (fracção S9), obtido após tratamento dos animais com Aroclor 1254 (policlorobifenilos), para indução das enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias tóxicas [46].

Existe um conjunto de estirpes bacterianas de *S. typhimurium* usadas no teste de Ames, sendo elas, TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 [44]. No entanto, as estirpes TA98 e TA100 são as mais usadas neste tipo de teste. A mutação na estirpe TA100 resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) e pode ser revertida para o estado selvagem por um composto mutagénico que cause uma substituição de pares de bases, num dos pares.

A mutação que ocorre na estirpe TA98 é do tipo -1 mudança de sequência, que afecta uma sequência próxima de uma sequência repetitiva – C-G-C-G-C-G-C-G- [44, 46]. Muitas das

substâncias consideradas como mutagénicas pelo teste de Ames também se mostraram capazes de causar cancro em animais e humanos [52].

- **Estudo com sesquiterpenóides**

No que respeita à toxicidade dos compostos sesquiterpénicos, até ao momento, conhece-se apenas o efeito referente ao α -bisabolol. Gomes-Carneiro *et al.* [64] estudaram a toxicidade do α -bisabolol na estirpe TA100 de *S. typhimurium*, tendo constatado a existência de um efeito tóxico (redução significativa do número de revertentes) numa gama entre as 150 e 5000 $\mu\text{g/placa}$ de composto sem activação metabólica e numa gama entre as 200 e 500 $\mu\text{g/placa}$ de composto com activação metabólica.

Posteriormente, na avaliação do efeito mutagénico do α -bisabolol verificaram que para a estirpe TA100, entre as 1 e 50 $\mu\text{g/placa}$ sem activação metabólica e entre as 1 e 100 $\mu\text{g/placa}$ com activação metabólica, não manifestou um efeito mutagénico. O mesmo acontece para a estirpe TA98, entre 1 e 50 $\mu\text{g/placa}$ sem activação metabólica e entre as 1 e 200 $\mu\text{g/placa}$ com activação metabólica. As estirpe TA97a que no intervalo entre as 1 e 100 $\mu\text{g/placa}$ sem activação metabólica e entre as 1 e 200 $\mu\text{g/placa}$ com activação metabólica, e para a estirpe TA1535 entre as 1 e 25 $\mu\text{g/placa}$ e as 1 e 100 $\mu\text{g/placa}$ sem e com activação metabólica, respectivamente, também não manifestam efeito mutagénico.

1.5. Actividade antimicrobiana

Os antibióticos têm a capacidade de inibir ou matar microrganismos, sendo utilizados com sucesso no tratamento de várias doenças de origem bacteriana quer em animais quer em humanos [49]. Os antimicrobianos são substâncias capazes de reduzir ou eliminar o crescimento de microrganismos (bactérias, leveduras e outros fungos). Os testes de susceptibilidade aos antibióticos são concebidos para medir a interacção entre as moléculas antimicrobianas e uma dada estirpe bacteriana. Os resultados ajudam a avaliar a sensibilidade ou a resistência da estirpe em causa [50].

A actividade antimicrobiana de um composto pode ser avaliada com base na determinação da concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor designado por MIC (Concentração Mínima Inibitória) [51]. A sensibilidade de um microrganismo pode ser facilmente determinada pelo método de difusão em placa de agar ou usando o método das diluições sucessivas para determinar a MIC necessária para inibir o crescimento deste microrganismo [52]. Neste estudo é utilizado o método de difusão em placa de agar, onde os discos de papel impregnados com concentrações conhecidas de diferentes antibióticos são colocados na superfície do meio de cultura sólido apropriado, previamente inoculado com o microrganismo cuja susceptibilidade se pretende determinar [51, 52, 53].

Durante a incubação a uma temperatura adequada para o crescimento do microrganismo teste, o agente antimicrobiano difunde-se para o meio sólido [51]. A concentração de cada agente no disco é específica. Após incubação, a presença e tamanho dos halos de inibição serão diferentes para os diferentes agentes antimicrobianos [52]. O diâmetro do halo de inibição está directamente relacionado com o grau de susceptibilidade do microrganismo.

O resultado é acompanhado por uma interpretação: a estirpe bacteriana é dita sensível, resistente ou intermediária (ou indeterminado) (Figura 11) [54].

Por norma, na classificação da susceptibilidade de bactérias a antibióticos, com base no método da difusão em placa de agar, recorre-se a procedimentos experimentais padronizados e a valores de referência (“standards”), previamente tabelados, do diâmetro dos halos de inibição (como por exemplo os divulgados pelo NCCLS - “National Committee for Clinical Laboratory Standards”, USA). O NCCLS é uma organização reconhecida internacionalmente, sem fins lucrativos, que tem como missão o desenvolvimento e divulgação de regras de boa prática laboratorial, assim como de procedimentos padronizados e de valores de referência a usar na avaliação da susceptibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos quimioterapêuticos [51].

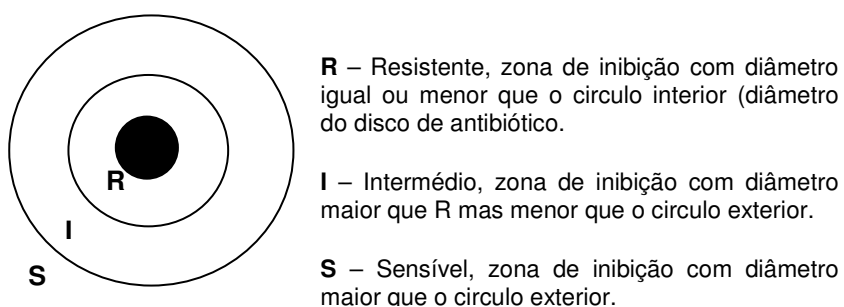


Figura 11. Interpretação do tamanho das zonas de inibição do crescimento bacteriano, causadas pelo antibiótico [53].

A Tabela 3 apresenta um conjunto de antibióticos seleccionados com base na sua relevância clínica, os quais serão utilizados neste trabalho para estudar a susceptibilidade de *S.aureus* e de *E.coli* aos antibióticos quando na presença de diferentes massas dos vários sesquiterpenóides.

Tabela 3. Classificação e mecanismo de acção dos antibióticos usados neste trabalho (Adaptado [52]).

Classificação do antibiótico	Antibiótico	Mecanismo de acção
Tetraciclina	Tetraciclina	Inibidores da síntese proteica a nível da subunidade 30S dos ribossomas.
β -lactâmico/ β -lactamase	Amoxicilina/ Ác. clavulânico	Inibidores da síntese da parede celular
Cefalosporina III	Ceftazidima	Inibidores da síntese da parede celular.
Macrólidos	Eritromicina	Inibidores síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomas
Fluroquinolona	Ciprofloxacina	Inibição da DNA girase.
β -lactâmicos	Penicilina G	Inibidores da síntese da parede celular.
Carbapenênicos	Imipenemo	Inibidores da síntese da parede celular.
Aminoglicósidos	Vancomicina	Inibidores da síntese da parede celular.

• Estudos com sesquiterpenóides

Num estudo prévio Brehm-Stecher *et al.* [55], verificaram que o nerolidol, o farnesol, e o α -bisabolol promovem o rompimento da membrana da célula bacteriana, permitindo a penetração na célula de solutos exógenos, como o brometo de etilo e antibióticos. Foi também estudada a capacidade destes sesquiterpenóides para aumentar a susceptibilidade bacteriana a vários antibióticos com importância clínica.

A presença de soluções de sesquiterpenóides com concentrações entre os 0,5 a 2 mM promove o aumento da susceptibilidade de *S. aureus* à ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina, sugerindo um papel geral para os sesquiterpenóides como potenciadores da permeabilidade bacteriana inespecífica aos antibióticos e antimicrobianos. Constataram ainda, que a maior eficácia dos sesquiterpenóides como potenciadores da permeabilidade da membrana pode derivar da sua semelhança estrutural com a membrana lipídica (por exemplo, moléculas lineares com carácter lipofílico interno e um término mais polar).

Mais recentemente, Simões *et al.* [22], também estudaram a susceptibilidade de *S. aureus* e de *E. coli* aos antibióticos, através do método de difusão em placa de agar. Os resultados mostraram um aumento da actividade antimicrobiana dos antibióticos ciprofloxacina, gentamicina e vancomicina aplicados para inibir o crescimento de *S. aureus*, na presença de guaiazuleno e nerolidol, e eritromicina, e vancomicina na presença de germacreno D. Já a *E. coli* mostrou-se insusceptível aos antibióticos na presença dos mesmos sesquiterpenóides.

1.6. Objectivos

Os principais objectivos deste trabalho são a caracterização da composição volátil do bagaço e do respectivo destilado, com enfoque nos compostos sesquiterpénicos e a avaliação do efeito da adição destes compostos na actividade antimicrobiana de antibióticos.

Para se atingir estes objectivos, foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos:

- Optimização da metodologia de HS-SPME/GC-MS, para a caracterização da fracção volátil do bagaço de uva e do respectivo destilado por HS-SPME/GC-MS;
- Avaliação da toxicidade e mutagenicidade dos sesquiterpenóides (padrão) usando o teste de Ames;
- Avaliação da actividade antimicrobiana dos antibióticos na presença de sesquiterpenóides recorrendo ao método de difusão em placa de agar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da fracção volátil do bagaço de *Vitis vinifera* L. e do respectivo destilado

Na caracterização da fracção volátil do bagaço de *Vitis vinifera* L. e do destilado resultante da destilação por arrastamento de vapor do bagaço, utilizou-se como técnica de extracção/concentração a HS-SPME e como método de separação e identificação o GC-MS.

2.1.1. Amostras

O bagaço usado no presente trabalho foi obtido após prensagem de uma mistura de castas de *Vitis vinifera* L. da região Demarcada da Bairrada, da colheita de 2008. Este bagaço continha: 50% da casta Baga, 30% Syrah, 10% Água Santa e 10% Tinta Roriz. Este resíduo foi armazenado a - 20 °C para preservar todas as suas propriedades.

2.1.2. Reagentes e materiais

Foi usado o cloreto de sódio (Pronalab). Foram utilizados frascos de vidro com tampa de rosca e septo (Btyl-Rubber Stoppers, Grey, Zomm) da Aldrich, um suporte manual de SPME da Supelco (Aldrich, Bellefonte, PA) e duas fibras de diferentes polaridades. As duas fibras testadas foram as de polidimetilsiloxano (PDMS) e a divenilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com uma fase estacionária de 100 e de 50/30 µm de espessura, respectivamente, sendo estas também adquiridas da Sulpenco.

2.1.3. Metodologia de HS-SPME

Foi usada uma metodologia baseada no trabalho de Coelho *et al.* [15], tendo sido feitas algumas alterações, tais como o uso de um frasco de vidro com maior capacidade (133 mL) e a adição de água à amostra, para permitir dissolução do sal e facilitar a agitação.

Para cada ensaio foi previamente descongelado bagaço durante uma hora. Após este tempo foram colocados num frasco de vidro de 133 mL, 9,0 g de cloreto de sódio (0,2 g NaCl por mL), uma barra magnética de 2,5 cm, a 1000 rpm (usada para agitar a amostra) e 15,0 g de bagaço. Seguidamente, adicionou-se 30,0 mL de água a um volume final de 45 mL, que corresponde a razão β entre o volume da fase líquida e o volume de espaço-de-cabeça de 0,5. Depois o frasco foi colocado num banho de água termostaticado ajustado a uma temperatura de 40 °C durante 60 minutos para promover a transferência dos compostos da amostra para o espaço-de-cabeça. Após esta etapa, a fibra de SPME foi inserida manualmente no espaço-de-cabeça da amostra por 60 minutos.

2.1.3.1. *Seleção da fase estacionária de SPME*

Foram testadas duas fibras, PDMS com espessura do filme de 100 μm e a PDMS/CAR/DVB com a espessura do filme de 50/30 μm . De acordo com o fabricante (Sigma-Aldrich), a fibra PDMS é indicada para compostos apolares e a PDMS/CAR/DVB mais polares. Para otimizar este parâmetro foi usada a metodologia referida anteriormente.

2.1.3.2. *Caracterização da fracção volátil do bagaço de *Vitis vinifera* L. e da fracção volátil do destilado do bagaço*

A caracterização da fracção volátil do bagaço e do destilado foi realizada de acordo com a metodologia descrita em 2.1.3, usando a fibra PDMS/CAR/DVB. A fibra retraída no suporte de SPME foi retirada do frasco e transportada até ao GC-MS, onde foi inserida no injector. Para o destilado resultante da destilação do bagaço foi seguido o procedimento descrito anteriormente para o bagaço, com um volume de destilado de 45 mL. Em cada ensaio foram feitas três réplicas.

2.1.4. *Análise por GC-MS*

A fibra de SPME contendo os compostos voláteis sorvidos é introduzida no injector do cromatógrafo da Agilent Technologies 6890N Network GC System, que se encontrava a 250°C, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP, com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme (Agilent Technologies, J&W Scientific, USA), onde permaneceu 5 minutos, para permitir a desorção térmica dos compostos. O programa de temperatura do forno foi de 35°C durante 3 minutos, 65°C a 2°C por minuto, seguido de 65°C para 90°C a 1°C por minuto, 90°C (3 minutos) para 150°C a 2°C por minuto e por fim 150°C para 220°C a 10°C por minuto. O Hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,7 mL/min e a pressão na cabeça da coluna foi de 12 psi. O espectrómetro de massa (Agilent Technologies, modelo 5973 Network Mass Selective) operou por impacto electrónico (EI) a 70 eV, com varrimento entre 30-300 m/z a 1 ciclo/s. A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação com os seus espectros de massa e tempo de retenção com padrões puros, quando disponíveis e com os espectros de massa da base de dados Wiley 275. Entre cada três análises, foi realizado um branco, que corresponde à análise da fibra sem contacto prévio com a amostra. A cada composto identificado por HS-SPME/GC-MS correspondeu uma área cromatográfica, obtida pela média das réplicas efectuadas para o bagaço e para o respectivo destilado. A reprodutibilidade das réplicas foi expressa pelo coeficiente de variação (CV).

2.2. Avaliação da toxicidade e mutagenicidade dos compostos sesquiterpénicos

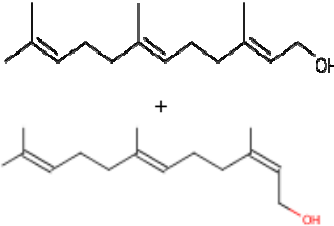
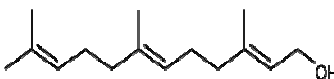
O estudo da toxicidade e mutagenicidade dos compostos sesquiterpénicos foi realizado recorrendo ao Teste de Ames ou Teste de mutação reversa. O princípio básico deste teste é baseado na utilização de estirpes mutantes de *S. typhimurium*, que não são capazes de sintetizar o aminoácido essencial histidina, e, portanto, a crescer num meio sem o mesmo. No entanto, quando submetidos a mutagénicos, tais mutações podem ser revertidas, permitindo às células crescer e formar colónias em meio sem histidina [44, 56, 57].

2.2.1. Reagentes e materiais

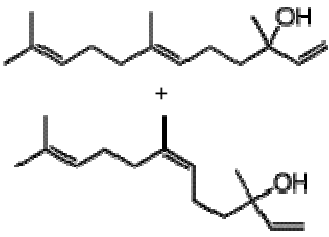
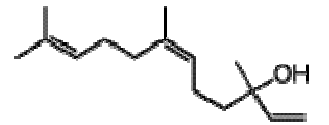
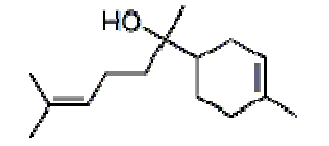
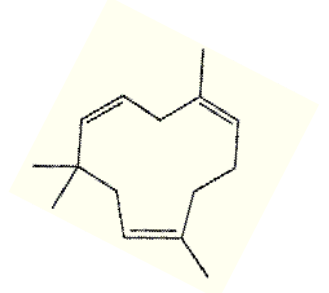
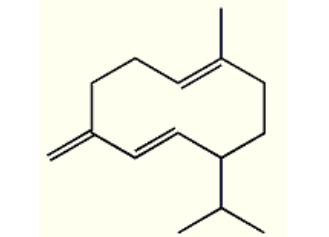
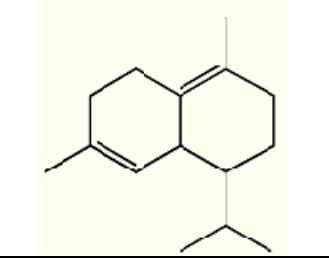
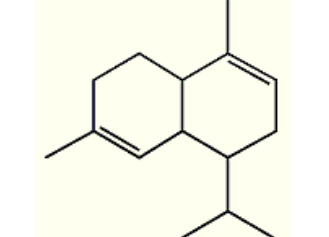
Para avaliar a toxicidade e mutagenicidade foram seleccionados 10 sesquiterpenóides com base nos compostos identificados no bagaço e no destilado por SPME, na estrutura química, número de grupos substituintes e a sua disponibilidade em laboratório (Tabela 4). Assim, foram escolhidos os seguintes sesquiterpenóides: *trans*-farnesol (96%), nerolidol (98%, mistura racemica de isómeros *cis* e *trans*) e *cis*-nerolidol (97%) da Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI, USA), α -bisabolol (95%), valenceno (>70%), *trans*-cariofileno (98,5%), (+)-aromadendreno (97%), (-)- α -neocloveno, e α -cedreno(99%) da Fluka (Buchs, Switzerland) e guaiazuleno (98%) da N.V. (Zwijndrecht, Belgium).

O etanol absoluto foi usado como solvente para a preparação das soluções dos sesquiterpenóides e respectivas diluições.

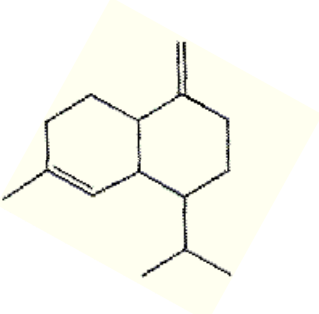
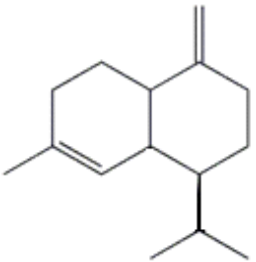
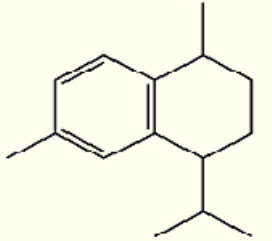
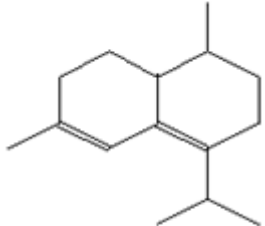
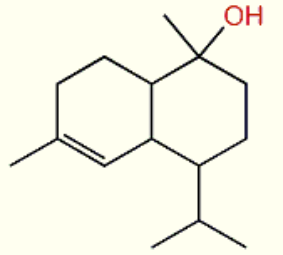
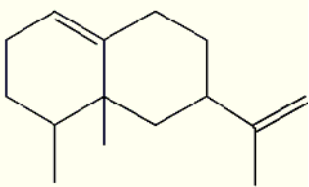
Tabela 4. Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório e identificados na fracção volátil do bagaço e respectivo destilado.

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
Farnesol (mistura de isómeros <i>trans</i> e <i>cis</i>)		4602-84-0	-	+
<i>trans</i> -Farnesol		106-28-5	+	+

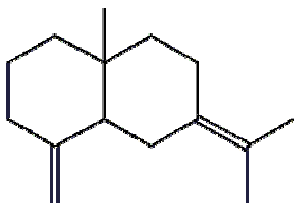
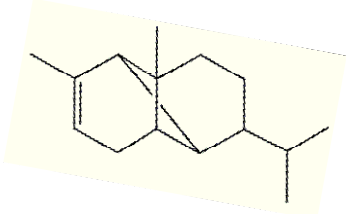
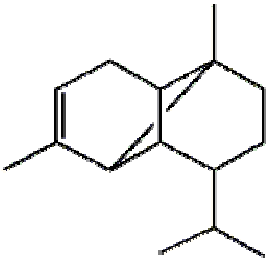
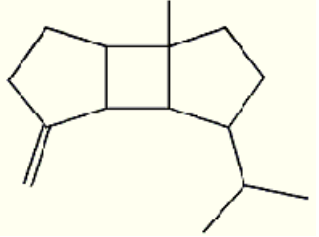
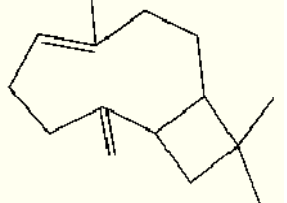
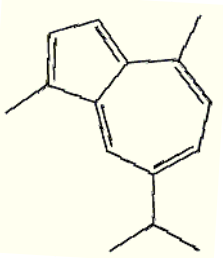
2. Materiais e métodos

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
Nerolidol (mistura de isômeros <i>trans</i> e <i>cis</i>)		7212-44-4	+	+
<i>cis</i> -Nerolidol		3790-78-1	+	-
α -Bisabolol		515-69-5	+	-
α -Humuleno		6753-98-6	+	-
Germacreno-D		23986-74-5	-	+
δ -Cadinene		483-76-1	-	+
α -Amorfeno		483-75-0	-	+

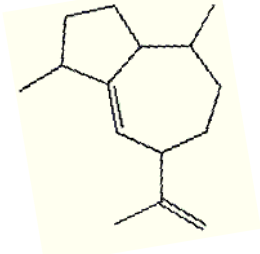
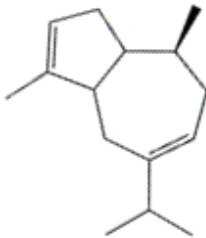
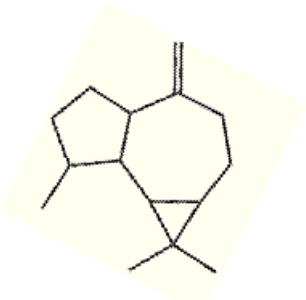
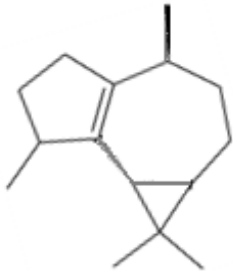
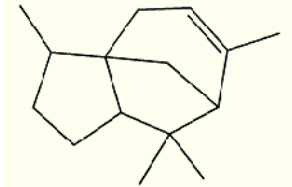
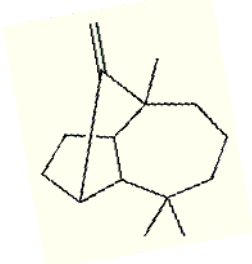
2. Materiais e métodos

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
α -Muroleno		30021-74-0	-	+
γ -Cadideno		39029-41-9	-	+
Calameneno		483-77-2	-	+
Epizonareno		41702-63-0	-	+
α -Cadinol		481-34-5	-	+
Valenceno		4630-07-3	+	+

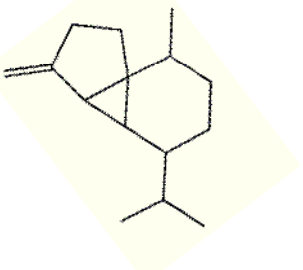
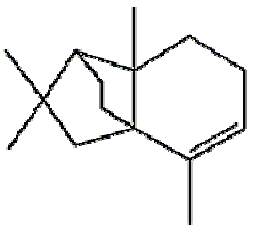
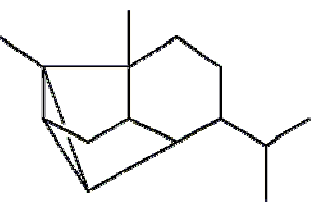
2. Materiais e métodos

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
γ -Selineno		515-17-3	-	+
α -Ilangleno		14912-44-8	-	+
(-)- α -Copaeno		3856-25-5	+	-
β -Borbureno		5208-59-3	-	+
<i>trans</i> -Cariofileno		87-44-5	+	+
Guaiazuleno		489-84-9	+	-

2. Materiais e métodos

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
γ -Gurjuneno		22567-17-5	-	+
3, 7-Guaiadieno		6754-04-7	-	+
(+)-Aromadendreno		489-39-4	+	+
Isoledeno		95910-36-4	-	+
α -Cedreno		469-61-4	+	-
Junipeno		475-20-7	-	+

2. Materiais e métodos

Nome	Estrutura	CAS	Sesquiterpenóides disponíveis em laboratório	Sesquiterpenóides identificados no bagaço e/ou no destilado por SPME
β -Cubebeno		13744-15-5	-	+
(-)- α -Neocloveno		4545-68-0	+	-
(+)-Ciclosativeno		22469-52-9	-	+

2.2.2. Preparação das soluções de sesquiterpenóides

A partir dos padrões puros dos sesquiterpenóides prepararam-se soluções-mãe, a partir das quais se prepararam as soluções de trabalho. A tabela seguinte apresenta as concentrações das soluções-mãe e as soluções de trabalho em g/L e em mM correspondentes a cada um dos compostos. Todas as soluções foram conservadas no frio.

2. Materiais e métodos

Tabela 5. Concentrações das soluções-mãe e de trabalho, correspondentes a cada sesquiterpenóide.

Composto	Massa molar (g/mol)	Concentração da solução-mãe		Concentração da solução de trabalho	
		(g/L)	(mM)	(g/L)	(mM)
<i>trans</i> -Farnesol	222,37	33,4	150	4,4	20
Nerolidol	222,37	34,2	154	4,4	20
<i>cis</i> -Nerolidol	222,37	33,6	151	4,4	20
α -Bisabolol	222,37	35,4	159	4,4	20
Valenceno	204,35	32,3	158	4,1	20
Guaiazuleno	198,30	30,7	155	3,9	20
<i>trans</i> -Cariofileno	204,35	35,6	174	4,1	20
(-)- α -Neoclaveno	204,36	35,8	175	4,1	20
(+)-Aromadendreno	204,35	35,4	173	4,1	20
α -Cedreno	204,35	40,5	198	4,1	20

Para esterilizar as soluções preparadas a partir dos padrões puros usaram-se seringas Monouso, 20 ml ECC. (PP+PE), PENTA FERTE, CAMPLI (TE) Italy e filtros de seringas estéreis de acetato de celulose com 0,2 μ m.

2.2.3. Teste de Ames

Os compostos sesquiterpénicos e respectivas diluições foram testados com duas estirpes, TA98 e TA100 de *S. typhimurium* His⁻, seguindo o procedimento descrito para o ensaio com pré-incubação de forma a aumentar o contacto das células bacterianas com os compostos [57]. As bactérias foram colocadas a crescer em 50 mL de nutriente de Broth, as quais foram incubadas cerca de 12h até atingirem uma densidade de $1-2 \times 10^9$ (CFU/mL) [57]. Posteriormente, a bactéria foi pré-incubada numa mistura de 500 μ L de tampão fosfato ou de solução S9, 50 μ L das soluções de sesquiterpenóides (Tabela 6) e 50 μ L da bactéria em nutriente de Broth, durante 30 minutos a 37 °C. Após o período de pré-incubação, a cada tubo de ensaio foram adicionados 2 ml de agar de topo (agar, cloreto de sódio e solução de histidina/biotina), com uma concentração vestigial de histidina (96 mg/L), tendo sido a mistura espalhada nas placas de petri com agar de topo enriquecido com glucose e com uma solução de sais (solução de Vogel-Bonner). Seguidamente as placas foram deixadas a secar sempre na câmara de fluxo laminar. Depois de secas, as placas foram fechadas e incubadas na estufa, invertidas a 37 °C, durante 48h. Para os ensaios que foram realizados com activação metabólica *in vitro* dos compostos, utilizou-se uma solução de enzimas microssomais preparadas a partir de fígado de ratos (S9) Sprague-Dawley induzidos com Aroclor

2. Materiais e métodos

1254 adquiridas a partir de Trinova, Biochem®. Foram preparados controlos negativos com etanol, em que os compostos sesquiterpénicos foram substituídos por 50 µL etanol.

Os controlos positivos foram preparados com substâncias de acção mutagénica conhecida, nomeadamente: nitrofurantoína (10 µg/placa) e 2-nitroflureno (10 µg/placa), para as estirpes TA100 e TA98, respectivamente, nos ensaios sem S9. Para os ensaios com S9, o composto 2-aminoantraceno (10 µg/placa) foi usado como controlo positivo para ambas as estirpes.

Terminado o período de incubação, procedeu-se à contabilização das colónias revertentes [45]. Os resultados foram expressos em número médio de revertentes por placa [58].

Para analisar os efeitos mutagénicos dos compostos, usaram-se dois critérios: primeiro, a existência de uma relação positiva e significativa entre a massa de composto por placa e o número médio de colónias revertentes e, em segundo a existência de um registo do número médio de colónias revertentes superior ao dobro do número médio registado no controlo negativo [45, 46, 59].

Tabela 6. Massa (µg/placa) correspondente a 50 µL das respectivas soluções de sesquiterpenóides para as diferentes concentrações.

	Concentração das soluções em mM								
	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078
Composto	massa (µg/placa)								
Nerolidol	222	111	56	28	14	7	3,5	1,7	0,87
Guaiazuleno	198	99	50	25	12	-	-	-	-
cis-Nerolidol	222	111	56	28	14	-	-	-	-
trans-Cariofileno	204	102	51	26	13	-	-	-	-
α-Bisabolol	222	111	56	28	14	7	3,5	1,7	0,87
trans-Farnesol	222	111	56	28	14	7	3,5	1,7	0,87
(-)-α-Neoclaveno	204	102	51	26	13	-	-	-	-
α-Cedreno	204	102	51	26	13	-	-	-	-
Valenceno	204	102	51	26	13	-	-	-	-
(+)-Aromadendreno	204	102	51	26	13	-	-	-	-

2.3. Avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na actividade antimicrobiana de alguns antibióticos

A susceptibilidade dos antibióticos às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na presença de sesquiterpenóides foi avaliada pelo método da difusão em placa de agar.

2.3.1. Materiais e Métodos

Para avaliar a actividade antimicrobiana foram utilizadas duas estirpes bacterianas de origem hospitalar, uma pertencente ao grupo das bactérias de Gram negativo (*Escherichia coli*) e outra de Gram positivo (*Staphylococcus aureus*). O meio utilizado para cultivo dos microrganismos foi o Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck).

Os sesquiterpenóides utilizados neste teste foram os mesmos utilizados anteriormente para a avaliação da toxicidade e mutagenicidade, sendo eles: o nerolidol, guaiazuleno, *cis*-nerolidol, *trans*-Cariofileno, α -bisabolol, *trans*-farnesol, (-)- α -neocloveno, α -cedreno, valenceno e o (+)-aromadendreno. Os discos de antibióticos utilizados e as respectivas concentrações foram: tetraciclina 10 μ g, amoxicilina/ ác. clavulânico 30 μ g, ceftazidima 30 μ g, eritromicina 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, penicilina G 10 U, imipenemo 5-10 μ g, gentamicina 10 μ g e vancomicina 30 μ g (Oxoid, Portugal).

2.3.1.1. Método difusão em placa de agar

Duas a três colónias de cada bactéria foram inoculadas em 100 mL de meio TSB e incubadas entre 16-18h a 37°C e a 150 r.p.m. Num tubo de ensaio (diâmetro 16mm) foram colocados 3 mL de agar (0,7% w/v) Mueller-Hinton (Merk, Darmstadt, Germany), arrefecido a uma temperatura entre 40-45°C, aos quais foram adicionados 100 μ L de bactéria em meio TSB, de forma que a sua concentração final fosse de 10^7 CFU/mL. Foram adicionados 50 μ L das soluções de sesquiterpenóides à mistura anterior de forma a obter as seguintes massas por placa: 204, 198, 222, 51, 50, 7 e 3,5 μ g. A mistura foi misturada e vertida sobre placas contendo 20 mL de agar Mueller-Hinton (1,5% w/v). Depois de o agar solidificar, sobre este foram colocados, em posições equidistantes, os discos impregnados com os respectivos antibióticos. Foram feitas três réplicas para cada um dos antibióticos testados. O controlo negativo consistiu num ensaio semelhante ao descrito acima, mas ao qual não foram adicionados os sesquiterpenóides. Foram efectuadas 3 réplicas de cada controlo.

As placas foram incubadas a 37°C durante 16-18h. Ao fim deste tempo foram medidos os diâmetros dos halos (mm) de inibição de crescimento das estirpes em avaliação.

2.3.2. Análise estatística

O teste de Ames e o método de difusão em placa de agar foram realizados em triplicado. Os dados foram analisados utilizando Sigmastat (Systat Software, Inc., ver. 3,5). A análise da variância simples (one-way ANOVA) foi aplicada para verificar se existiam diferenças significativas entre as diferentes massas/placa para cada composto individualmente comparativamente com o controlo negativo. Quando foram registadas diferenças estatisticamente significativas, foi usado o teste Holm-Sidak, que permite observar quais as massas/placa é que apresentaram diferenças

significativas relativamente ao controlo negativo. Todos os dados foram apresentados sob a forma média \pm desvio padrão. Os valores foram considerados significativamente diferentes do controle negativo para $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da fracção volátil do bagaço de *Vitis vinífera* L. e do respectivo destilado obtido por destilação por arrastamento de vapor

3.1.1. Selecção da fase estacionária de SPME

Para a optimização da metodologia HS-SPME/GC-MS, no que respeita à fase estacionária, no sistema de três fases, foram usadas duas fases estacionárias diferentes, PDMS e PDMS/CAR/DVB, onde as áreas obtidas são comparadas entre si.

A Tabela 7 indica a média das áreas cromatográficas obtidas por análise da composição volátil do bagaço em função da fase estacionária usada. Em termos de área total, a fase estacionária de PDMS apresentou uma área cromatográfica na ordem dos 712×10^7 e a fase estacionária de PDMS/CAR/DVB na ordem dos 1862×10^7 .

Com a fase estacionária de PDMS, foram identificados 35 compostos: 20 ésteres, 2 aldeídos, 1 hidrocarboneto, 4 álcoois, 4 ácidos e 3 sesquiterpenos (Tabela 7 e Figura 12.A). Em termos de áreas, as famílias com maior área cromatográfica são os ésteres com 82% e os álcoois com 15%. De seguida os aldeídos e os ácidos com 1% para as duas famílias, os sesquiterpenos e os hidrocarbonetos, com 0,4% e 0,2%, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das áreas obtidas para os compostos voláteis identificados no bagaço por HS-SPME/GC-MS usando duas fases estacionárias: PDMS e DVB/CAR/PDMS.

Nº Pico	Composto	Identificação	Área do pico de GC x 10 ⁷ (u.a) ^b			
			PDMS		DVB/CAR/PDMS	
			n=3	(CV)	n=3	(CV)
Aldeídos						
1	Acetaldeído	B, C	0,13	(17)	0,51	(18)
6	Hexanal	A, B, C	-	-	0,30	(20)
13	Heptanal	B	-	-	0,31	(12)
26	Benzaldeído	B	-	-	1,03	(49)
58	Octadecadienal	B	6,84	(8)	-	-
Subtotal (área)			6,96	(8)	2,16	(29)
Subtotal (%)			0,98		0,12	
Ésteres						
2	Acetato de etilo	B, C	61,57	(28)	81,1	(12)
4	Acetato isobutilo	B, C	1,06	(57)	1,86	(23)
5	Butanoato de etilo	B, C	0,21	(48)	-	-
8	Acetato de 3-metil-butilo	B	14,03	(75)	-	-
9	Acetato de isopentenilo	B, C	-	-	34,35	(17)

3. Resultados e Discussão

Nº Pico	Composto	Identificação	Área do pico de GC x 10 ⁷ (u.a) ^b			
			PDMS		DVB/CAR/PDMS	
			n=3	(CV)	n=3	(CV)
11	Hexanoato de etilo	B, C	3,78	(27)	14,28	(24)
12	Acetato de hexilo	B, C	-	-	1,90	(33)
14	Heptanoato de etilo	A, B	-	-	1,12	(28)
17	Octanoato de metilo	B, C	-	-	0,16	(19)
22	Octanoato de etilo	A, B, C	45,93	(24)	298,68	(9)
27	Nonanoato de etilo	A, B	1,30	(26)	8,44	(16)
36	Decanoato de metilo	B	0,25	(20)	1,47	(16)
38	Decanoato de etilo	A, B, C	269,28	(10)	836,76	(19)
39	Butanedionato de dietilo	B	-	-	49,96	(6)
40	Decenoato de etilo	B	9,52	(18)	6,07	(27)
43	Benzenoacetato de etilo	B	-	-	0,20	(89)
44	Undecanoato de etilo	B, C	0,62	(11)	0,81	(49)
45	Decanoato de isobutilo	B	0,68	(26)	1,35	(85)
47	Acetato 2-feniletilo	B	2,97	(14)	14,68	(81)
48	Dodecanoato de etilo	B	120,92	(7)	123,11	(46)
50	Decanoate isoamilo	B	7,93	(70)	-	-
52	Tetradecanoato de etilo	B, C	4,79	(7)	4,85	(46)
53	Laurato de isoamilo	B	-	-	0,70 ^a	-
54	Dodecanoato-3-metil-butilo	B	0,65	(8)	-	-
55	Hexadecanoato de metilo	B	-	-	0,67 ^a	-
56	Hexadecanoato de etilo	B, C	36,09	(10)	34,33	(38)
57	Octadecenoato de metilo	B	3,78	(20)	2,82	(34)
59	Linoleato de etilo	B	1,55	(24)	4,65	(46)
60	Vanilato de etilo	A, B, C	0,18	(20)	-	-
Subtotal (área)			587,11	(10)	1524,38	(17)
Subtotal (%)			82,48		81,85	
Hidrocarbonetos						
16	Hepteno	B	-	-	0,13	(8)
18	Tetradecano	B, C	-	-	3,43	(53)
19	Metil-ciclopentano	B	1,66	(105)	-	-
24	Pentadecano	B, C	-	-	0,15	(37)
Subtotal (área)			1,66	(105)	3,71	(50)
Subtotal (%)			0,23		0,20	
Álcoois						
3	Etanol	A, B, C	65,82	(17)	90,43	(19)
7	2-Metil-1-propanol	B, C	2,07	(26)	3,92	(5)
10	3-Metil-1-butanol	B, C	36,61	(16)	89,69	(15)
15	Hexanol	A, B, C	2,10	(3)	6,52	(13)
49	Feniletanol	B	-	-	135,29	(20)

3. Resultados e Discussão

Nº Pico	Composto	Identificação	Área do pico de GC x 10 ⁷ (u.a) ^b			
			PDMS		DVB/CAR/PDMS	
			n=3	(CV)	n=3	(CV)
Subtotal (área)			106,60	(6)	325,85	(16)
Subtotal (%)			14,97		17,42	
Ácidos						
21	Ácido acético	A, B, C	2,75	(47)	-	-
51	Ácido octanóico	B, C	-	-	2,44	(112)
61	Ácido tetradecanóico	B	0,83	(6)	-	-
62	Ácido pentadecanóico	B	0,33	(34)	-	-
63	Ácido hexadecanóico	B	3,05	(42)	-	-
Subtotal (área)			6,95	(38)	2,44	(16)
Subtotal (%)			0,98		0,13	
Sesquiterpenos						
20	α-Ilangleno	B, C	2,79	(17)	-	-
23	β-Borbureno	B, C	-	-	0,75	(37)
25	Junipeno	B	-	-	0,01	(46)
28	trans-Cariofileno	A, B, C	-	-	0,04	(128)
29	N.I. (m/z 43, 105, 119, 161)	B	-	-	0,08	(48)
30	3, 7 - Guaidieno	B, C	-	-	0,25 ^a	-
31	N.I. (m/z 43, 55, 105, 161)	B	-	-	0,07	(71)
32	α-Gurjuneno	B, C	-	-	0,05 ^a	-
33	β-Guaieno	B	0,38	(15)	-	-
34	N.I. (m/z 55, 96, 105, 161)	B	-	-	0,55	(28)
35	Aromadendreno	A, B, C	0,47	(8)	0,16	(47)
37	β-Sesquifelandreno	B, C	-	-	0,04 ^a	-
41	N.I. (m/z 41, 55, 88,101)	B	-	-	0,79	(10)
42	γ-Cadideno	A, B, C	-	-	0,60 ^a	-
46	Calameneno	A, B, C	-	-	0,44 ^a	-
Subtotal (área)			3,64	(19)	3,82	(8)
Subtotal (%)			0,51		0,21	
Total (área)			712	(8)	1862,37	(17)

N.I.) Não identificado.

CV – Coeficiente de variação expresso em %.

^a - Identificado numa única réplica.

^b – u. a. Unidade arbitrária

- Ausente na amostra.

A - Espectro de massa e tempo de retenção consistente com o padrão puro.

B - Espectro dado pela base de dados da Wiley 275.

C- Espectro de massa consistente com o espectro encontrado na literatura.

Relativamente à fase estacionária de DVB/CAR/PDMS, foram identificados um total de 50 compostos: 24 ésteres, 5 álcoois, 4 aldeídos, 3 hidrocarbonetos, 1 ácido e 13 sesquiterpenos (Tabela 7 e Figura 12.A). Isto corresponde a 82%, 17,4%, 0,1%, 0,2%, 0,1% e 0,2% da área

3. Resultados e Discussão

cromatográfica total, respectivamente (Tabela 7). Os grupos de compostos, que mais contribuíram para a área cromatográfica total foram os ésteres e os álcoois, à semelhança do que acontece com a fase estacionária de PDMS.

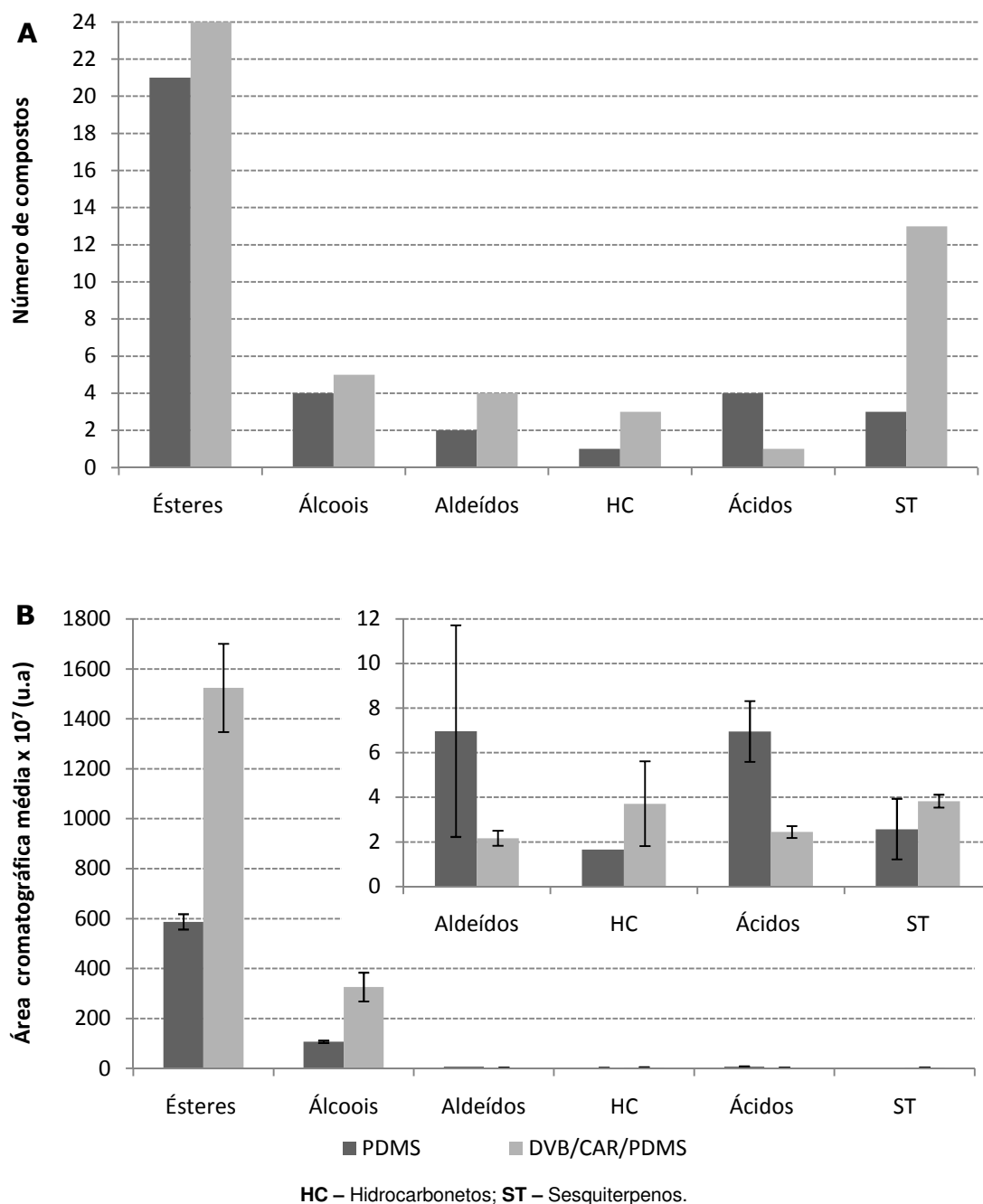


Figura 12. Representação gráfica dos compostos divididos por famílias, identificados por HS-SPME/GC-MS, usando as fases estacionárias de PDMS e de DVB/CAR/PDMS. (A) Número de compostos por família, (B) Área cromatográfica média dos compostos por família.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, verifica-se que a fase estacionária DVB/CAR/PDMS foi mais eficiente na extracção de aldeídos, no que respeita ao número de compostos extraídos (4). No entanto, com a fase estacionária de PDMS obteve-se uma maior área cromatográfica. Para os ésteres, hidrocarbonetos, álcoois e sesquiterpenos a fase estacionária DVB/CAR/PDMS apresenta uma maior eficiência extractiva, visível por um maior número de compostos extraídos. Por sua vez, com a fase de estacionária de PDMS extraiu-se um maior número de ácidos, com uma área cromatográfica superior à obtida pela DVB/CAR/PDMS.

A nível de reprodutibilidade (expressa em coeficiente de variação, CV (%)), é possível verificar que a fase estacionária de PDMS apresenta maior reprodutibilidade para o grupo dos aldeídos, ésteres e álcoois com coeficientes de variação de 8, 10 e 6, respectivamente. Por outro lado, a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS possui uma maior reprodutibilidade para o grupo dos hidrocarbonetos, ácidos e os sesquiterpenos, com coeficientes de variação de 50, 16 e 8, respectivamente. Contudo, pode afirmar-se que de uma forma geral os coeficientes de variação não são elevados, para ambas as fases estacionárias, com excepção do CV obtido para o ácido octanóico (CV de 112) e *trans*-cariofileno (CV de 128), extraídos com a fase de estacionária de DVB/CAR/PDMS e do metil-ciclopentano (CV de 105) para a fase de estacionária de PDMS.

Assim, de acordo com os resultados é possível concluir que com a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS se conseguem extrair um maior número de compostos (50 compostos, dos quais 13 são sesquiterpenos), quando comparada com a fibra de PDMS (35 compostos, sendo 3 sesquiterpenos). Neste sentido, estabeleceu-se que a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS seria a mais adequada para caracterizar a fracção volátil do bagaço e do destilado do bagaço, por mostrar ser a mais eficiente na extracção dos compostos pretendidos.

3.1.2. Caracterização da fracção volátil do bagaço e do respectivo destilado

Após a fase de selecção da fibra, procedeu-se à caracterização da fracção volátil do bagaço e do seu destilado. A Tabela 8 apresenta a média das áreas obtidas para os compostos identificados nas amostras de bagaço e do destilado, agrupados em famílias. A amostra de bagaço apresentou uma área cromatográfica total de $865,11 \times 10^7$ e o destilado de $269,9 \times 10^7$.

Em termos de compostos extraídos, os ésteres representam a família com o maior número de compostos identificados, quer para o bagaço (35 compostos) quer para o destilado (28 compostos). Seguidamente, os sesquiterpenóides são o segundo grupo mais abundante com 22 compostos identificados no bagaço e 19 no destilado. No bagaço, foram ainda identificados 5 aldeídos, 9 hidrocarbonetos, 1 cetona, 14 álcoois e 4 ácidos e 1 monoterpene. No que respeita à amostra do destilado, foram identificados 11 aldeídos, 2 hidrocarbonetos, 11 álcoois, 5 ácidos, 2 monoterpénóides e 2 norisoprenóides (Tabela 8 e Figura 13.A e B).

3. Resultados e Discussão

Tabela 8. Média das áreas obtidas para os compostos identificados no bagaço e do destilado, por HS-SPME, usando a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS.

Nº Pico	Composto	Identificação	Área média do pico de GC x 10 ⁷ (u.a)			
			Bagaço		Destilado	
			n=3	CV	n=3	CV
Aldeídos						
4	Etanal	B, C	-	-	0,16	(35)
12	Hexanal	A, B, C	0,22	(16)	0,15	(18)
21	Heptanal	B, C	1,05	(49)	0,16	(60)
26	Nonanal	B, C	0,09	(27)	0,54	(74)
33	Heptadienal	B, C	-	-	0,16	(39)
36	Furfural	B	-	-	0,31	(69)
42	Benzaldeído	B	1,19	(19)	0,45	(14)
44	Nonenal	B, C	-	-	0,40	(144)
62	Decenal	B	4,85	(25)	0,64	(75)
68	Nonadienal	B, C	-	-	0,34	(52)
90	Decadienal	B, C	-	-	1,80	(74)
Subtotal (área)			8,13	(5)	5,11	(25)
Subtotal (%)			0,93		1,89	
Ésteres						
5	Acetato de etilo	B, C	82,47	(14)	12,38	(68)
7	Acetato de isobutilo	B, C	1,70	(25)	-	-
8	Butanoato de etilo	B	0,30	(21)	-	-
9	Metilbutirato de etilo	B	0,28	-	-	-
10	Isopentanoato de etilo	B	0,06	-	-	-
11	Acetato de butilo	B, C	0,11	(84)	-	-
14	Acetato de isoamilo	B	-	-	2,06	(119)
15	Acetato 3-metil-1-butanol	B, C	25,38	(29)	7,45	(48)
18	Hexanoato de etilo	A, B, C	7,54	(29)	2,31	(89)
19	Acetato de hexilo	B, C	1,54	(26)	0,43	(93)
22	Heptanoato de etilo	A, B	0,61	(14)	-	-
24	Acetato de heptilo	B	0,13	(12)	-	-
25	Octanoato de metilo	B, C	0,19	(18)	-	-
28	Octanoato de etilo	A, B, C	92,66	(20)	20,28	(78)
31	Octanoato-3-metilbutilo	B	0,83	(18)	0,20	(35)
43	Nonanoato de etilo	A, B	3,46	(22)	0,70	(140)
46	Octanoato-2-metilpropilo	B	0,45	(28)	-	-
50	Acetato de nonanol	B	0,35	(7)	-	-
54	Decanoato de metilo	B	0,91	(21)	0,32	(40)
61	Decanoato de etilo	A, B	291,55	(20)	84,60	(29)
63	Octanoato de isoamilo	B, C	-	-	1,61	(55)
65	Succinato de etilo	B, C	24,65	(12)	2,56	(97)
67	9-Decanoato de etilo	B	15,34	(19)	4,53	(60)

3. Resultados e Discussão

Nº Pico	Composto	Identificação	Área média do pico de GC x 10 ⁷ (u.a)			
			Bagaço		Destilado	
			n=3	CV	n=3	CV
75	Acetato de benzilo	B	0,12	(22)	-	-
76	Undecanoato de etilo	B	0,49	(8)	0,30	(24)
78	Decanoato de isobutilo	B	0,62	(31)	0,49	(34)
85	Glutarato de etilo	B	0,11	(12)	-	-
86	Salicilato de metilo	B	0,22	(3)	0,12	(32)
89	Dodecanoato de metilo	B	0,23	(14)	0,23	(26)
92	Acetato de fenitilo	B, C	11,41	(16)	2,85	(90)
94	Dodecanoato de etilo	B	57,58	(19)	39,95	(21)
96	Decanoato-3-metilbutilo	B	4,30	(25)	2,39	(25)
99	Butanodiato 3-metilbutil-etilo	B, C	2,58	(15)	3,61	(76)
103	Linoleato de etilo	B	0,65	(40)	3,53	(23)
106	Miristato de etilo	B	2,40	(7)	3,50	(11)
108	Decanoato 2-metilbutilo	B	-	-	0,10	(12)
109	Hidroxiocetanoato de etilo	B	-	-	0,45	(67)
110	Pentadecanoato de etilo	B	-	-	0,21	(127)
113	Hexadecanoato de etilo	B	6,32	(16)	12,80	(5)
117	Hexadecenoato de etilo	B	1,52	(21)	6,19	(4)
Subtotal (área)			639,09	(18)	216,15	(33)
Subtotal (%)			73,87		80,08	
Hidrocarbonetos						
1	Metil-pentano	B	0,85	(73)	-	-
2	Hexano	B, C	4,19	(58)	-	-
3	Metil-ciclopentano	B	0,68	(67)	-	-
16	Dodecano	B	0,54	(3)	-	-
27	Tetradecano	B, C	1,49	(51)	-	-
30	Pentadecano	B, C	0,68	(15)	-	-
55	Hexadecano	B, C	0,45	(30)	0,13 ^a	-
69	Heptadecano	B	0,23 ^a	-	-	-
77	Naftaleno	B, C	-	-	0,25	(30)
88	Octadecano	B	0,99	(79)	-	-
Subtotal (área)			9,87	(16)	0,38	(37)
Subtotal (%)			1,79		0,14	
Cetona						
20	Amil-venil-cetona	B	0,25	(30)	-	-
Subtotal (área)			0,25	(31)	-	-
Subtotal (%)			0,03		-	-
Álcoois						
6	Etanol	B, C	59,06	(2)	7,56	(68)
13	2-Metil-1-propanol	B, C	2,47	(5)	0,36	(59)
17	3-Metil-1-butanol	B, C	44,14	(2)	4,73	(100)
23	Hexanol	A, B, C	4,54	(2)	0,86	(55)

3. Resultados e Discussão

Nº Pico	Composto	Identificação	Área média do pico de GC x 10 ⁷ (u.a)			
			Bagaço		Destilado	
			n=3	CV	n=3	CV
29	1-Octen-3-ol	B	0,33	(21)	0,13	(64)
30	Heptanol	A, B, C	0,47	(15)	0,16	(63)
38	2-Etil-1-hexanol	B	0,26	(13)	0,12	(60)
45	1, 3-Butanediol	B	0,53	(5)	-	-
47	Octanol	A, B	0,40	(12)	0,25	(90)
51	2, 3-Butanediol	A, B	0,16	(26)	-	-
60	2-(2-Etoxietoxi)-etanol	B	0,23	(12)	-	-
81	Decanol	A, B	-	-	0,98	(130)
97	Fenilmetanol	A, B	0,61	(7)	-	-
100	Feniletanol	B	62,14	(3)	6,36	(28)
102	Dodecanol	B, C	-	-	0,14	(31)
104	Fenol	A, B, C	0,29	(37)	-	-
Subtotal (área)			175,62	(2)	21,65	(74)
Subtotal (%)			20,17		8,02	
Ácidos						
32	Ácido acético	A, B, C	7,85	(7)	0,73	(18)
95	Ácido hexanóico	A, B	0,54	(28)	-	-
98	Ácido dodecanóico	B	-	-	4,34	(80)
107	Ácido octanóico	B, C	2,66	(6)	1,00	(159)
111	Ácido nonanóico	B, C	-	-	0,19	(90)
116	Ácido decanóico	B, C	2,87	(8)	11,63	(108)
Subtotal (área)			13,93	(6)	17,88	(87)
Subtotal (%)			1,61		6,63	
Norisoprenóides						
41	Vitispirano	B	-	-	0,13	(60)
101	β-Ionona	A, B	-	-	0,83	(60)
Subtotal (área)			-	-	0,95	(57)
Subtotal (%)			-	-	0,35	
Monoterpenóides						
58	β-Ciclocitral	B, C	-	-	0,19	(27)
82	Citronelol	A, B, C	0,37	(14)	0,26	(130)
Subtotal (área)			0,37	(15)	0,45	(64)
Subtotal (%)			0,04		0,17	
Sesquiterpenóides						
34	Cicloisotativeno	B, C	0,45	(80)	-	-
35	α-Ilangleno	B, C	8,59	(26)	0,75	(8)
37	α-Copaeno	A, B, C	0,99	(17)	-	-
40	β-Bourboneno	B, C	1,75	(21)	0,14	(8)
48	Junipeno	B, C	0,18	(57)	0,04	(89)
49	β-Cubebeno	A, B, C	0,09	(57)	-	-
52	Germacreno-D	A, B	0,04	(32)	-	-

3. Resultados e Discussão

Nº Pico	Composto	Identificação	Área média do pico de GC x 10 ⁷ (u.a)			
			Bagaço		Destilado	
			n=3	CV	n=3	CV
53	<i>trans</i> -Cariofileno	A, B, C	0,48	(28)	0,17	(27)
56	3, 7-Guaiadieno	B, C	0,85	(35)	0,17	-
57	N.I. (<i>m/z</i> 91, 105, 119, 161)	B	-	-	0,07	(100)
59	Isoledeno	B, C	0,45	(86)	-	-
64	β -Farneseno	B	-	-	0,37	(39)
66	α -Amorfeno	B	0,60	(74)	0,27	(3)
70	γ -Gurjuneno	B, C	0,06	(35)	-	-
71	Epizonareno	B, C	0,67	(38)	0,30	(9)
72	Valenceno	B, C	0,06	(76)	-	-
73	Aromadendreno	A, B, C	0,09	(150)	-	-
74	α -Muroleno	A, B	0,43	(11)	0,29	(87)
79	δ -Cadineno	A, B, C	0,16	(72)	0,50	(110)
80	γ -Cadideno	A, B, C	0,46	(63)	-	-
83	N.I. (<i>m/z</i> 91, 81, 105, 161)	B	-	-	0,06	(28)
84	γ -Selineno	B	0,07	(29)	-	-
87	N.I. (<i>m/z</i> 81, 91, 105, 161)	B	-	-	0,11	(120)
93	Calameneno	A, B, C	0,33	(31)	0,24	(10)
105	Nerolidol	A, B, C	0,18	(14)	1,04	(76)
112	α -Cadinol	B	-	-	0,13	(127)
114	Guaiazuleno	A, B	0,27	(13)	0,11	(15)
115	Farnesol	A, B	-	-	0,11	(107)
118	<i>trans</i> - Farnesol	A, B	-	-	1,05	(90)
Subtotal (área)			17,61	(20)	7,33	(27)
Subtotal (%)			2,04		2,72	
Total			865,11	(14)	269,92	(37)

N.I.- Não identificado

CV – Coeficiente de variação

^a - Identificado numa única réplica; - Ausente na amostra.

A - Espectro de massa e tempo de retenção consistente com o padrão puro.

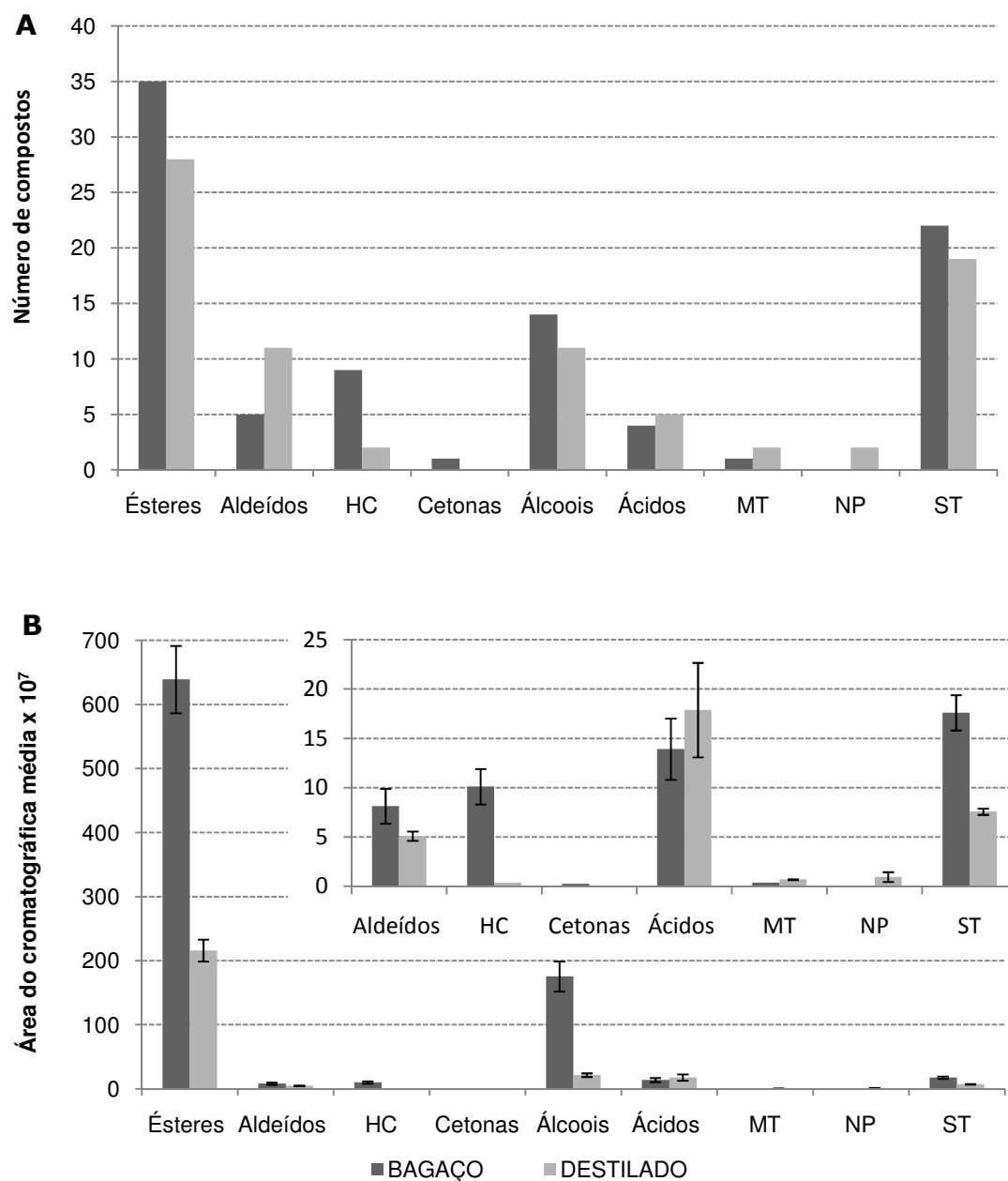
B - Espectro dado pela base de dados da Wiley 275.

C- Espectro de massa consistente com o espectro encontrado na literatura.

Os ésteres são o grupo de compostos com maior área cromatográfica total nas duas amostras. Estes compostos resultam do processo de fermentação e são considerados o principal grupo de produtos químicos da fracção volátil do vinho [60]. Os ésteres são geralmente associados ao aroma de fermentação dos vinhos, conferindo aromas florais e frutados [60, 61]. O decanoato de etilo é o éster mais abundante quer na amostra de bagaço como na do destilado, com 46% e 39%, respectivamente. No bagaço, ainda o octanoato de etilo (15%), acetato de etilo (13%) e o dodecanoato de etilo (9%) têm abundâncias significativas. No destilado, também o

3. Resultados e Discussão

dodecanoato de etilo (18%) e octanoato de etilo (9%) são os compostos mais abundantes (Figura 13.B).



HC – Hidrocarbonetos; MT – Monoterpenóides; NP – Norisoprenóides; ST – Sesquiterpenóides.

Figura 13. Representação gráfica dos compostos divididos por famílias, identificados por HS-SPME/GC-MS nas amostras de bagaço e do destilado, usando a fibra de DVB/CAR/PDMS. (A) Número de compostos por família, (B) Área cromatográfica média dos compostos por família.

Verifica-se que apesar de se identificarem um maior número de aldeídos na fracção volátil do destilado, é o bagaço que possui maior área cromatográfica total, sendo que o decenal corresponde a 60% da área total dos aldeídos, seguido do benzaldeído e do heptanal com 15% e

13% da área total, respectivamente. Por outro lado, no destilado o decadienal com 32% da área total é o composto mais abundante, seguido do decenal com 11%.

Em contrapartida, foi identificado um maior número de hidrocarbonetos na composição volátil do bagaço (10 compostos) comparativamente ao destilado com apenas um hidrocarboneto identificado, o hexadecano. No bagaço, o hexano e o tetradecano, com 40% e 15%, respectivamente, são os mais abundantes. Os hidrocarbonetos são compostos que contribuem para o aroma varietal. É na película da uva que se encontram os compostos repontáveis pelo aroma varietal.

Outro grupo de compostos identificados foi os álcoois. Estes podem aparecer nas uvas, onde são biossintetizados (álcoois aromáticos), outros são formados durante operações de pré-fermentação (álcoois em C6) e outros podem ainda ser formados durante a fermentação (etanol, 2,3-butanodiol, 2-feniletanol, etc.) [60]. No bagaço, dos 14 álcoois identificados três são aromáticos, o feniletanol com 35% da área total, que corresponde ao álcool mais abundante, o fenilmetanol e o fenol. O segundo mais abundante é o etanol (34%) e depois o 3-metil-1-butanol (25%). No que respeita ao destilado, é o etanol que aparece em maior quantidade, seguido do feniletanol e o do 3-metil-1-butanol.

Os ácidos identificados no vinho podem aparecer nas uvas e podem ser formados por actividade metabólica de leveduras durante a fermentação [60]. O ácido acético é o principal ácido do vinho, sendo que na fracção volátil do bagaço também é o mais abundante com 56% da área total dos ácidos, enquanto que na fracção volátil do destilado o composto mais abundante é o ácido decanóico com 65%.

Os norisoprenóides foram outro grupo de compostos identificados apenas na amostra do destilado, sendo eles o β -ionona e o vitispirano. Os norisoprenóides são compostos de aroma derivados de carotenóides, os quais foram reconhecidos pelo seu contributo para o aroma de vinhos tintos e brancos e em sumos de uvas [62]. Nas uvas, a degradação carotenóides, conduz ao aparecimento de norisoprenóides (C13), que são promovidos pela exposição ao sol [60], sendo responsáveis por odores florais e frutados.

Os monoterpenóides são o principal grupo de compostos responsáveis pelo aroma varietal de alguns vinhos. Os mais odorantes parecem ser o citrionelol, o linalol e o óxido de nerol [60]. Destes o citrionelol foi encontrado nas duas amostras. Sendo que no destilado, foram identificados mais um monoterpenóide, o β -ciclocitral.

Por último, o grupo de compostos alvo deste estudo, os sesquiterpenóides. Os sesquiterpenóides são compostos associados a odores de madeira, doce, floral, cravo e óleo. Por exemplo, o γ -cadideno e o α -ilangleno exibem um aroma a madeira. São compostos isoméricos com a mesma fórmula molecular, facto que dificulta a sua identificação/distinção, já que os espectros de massa são muito idênticos. Os picos dos iões característicos correspondem a um m/z de 161 e 204 [14]. Na amostra do bagaço foram identificados quatro sesquiterpenóides mais abundantes, o α -ilangleno com 48%, β -bourbureno, 10% α -copaeno 6% e o 3,7-guaiadieno com 5% da área total dos sesquiterpenóides. Relativamente à composição sesquiterpénica na fracção

volátil do destilado, o *trans*-farnesol é o mais abundante representando 14% da área total ($7,58 \times 10^7$), seguido do nerolidol e do α -ilangleno, com 14% e 10%, respectivamente.

De acordo com a Tabela 8, é possível constatar que em termos de reprodutibilidade em geral o bagaço possui coeficientes de variação menores, quando comparados com o destilado. Isto traduz-se numa maior reprodutibilidade para as amostras de bagaço. A menor reprodutibilidade dos resultados do destilado, poderão estar relacionados com as perdas da fracção volátil do destilado, que podem ocorrer durante a destilação ou mesmo durante a preparação das amostras.

Comparando os sesquiterpenóides identificados neste estudo com os sesquiterpenóides identificados em trabalhos anteriores nas variedades de *Vitis vinifera* L. (Tabela 1), verifica-se que à excepção do β -farneseno, γ -gurjuneno, γ -selineno, calameneno, α -cadinol, guaiazuleno e *trans*-farnesol, os restantes sesquiterpenóides já foram identificados. No caso do γ -selineno já foi identificado um isómero, o δ -selineno. É ainda possível observar que grande parte dos sesquiterpenóides identificados no bagaço e no destilado, também se encontram no vinho e na uva da casta Baga da *Vitis vinifera* L., sendo que o bagaço usado neste estudo é composto por 50% da casta Baga.

3.2. Avaliação da toxicidade e mutagenicidade dos compostos sesquiterpénicos

Após a caracterização da fracção volátil do bagaço e do destilado, foram seleccionados 10 sesquiterpenóides para se avaliar a sua toxicidade e a mutagenicidade. Esta etapa teve como objectivo estabelecer uma gama de massas para cada sesquiterpenóide que não apresentasse toxicidade, para posteriormente se avaliar o efeito da adição desses sesquiterpenóides na susceptibilidade bacteriana a antibióticos, nessas gamas de massas não tóxicas.

Os 10 padrões puros de sesquiterpenóides seleccionados foram: o nerolidol, o guaiazuleno e o *trans*-cariofileno que foram identificados no bagaço e no destilado; o valenceno e o aromadendreno identificados apenas no bagaço; o *trans*-farnesol presente no destilado; o α -cedreno que embora não tenha sido identificado nas amostras em estudo, já havia sido identificado em amostras de vinho e engaços de uva da variedade Baga (Tabela 1). Por fim, na selecção dos restantes sesquiterpenóides, *cis*-nerolidol, α -bisabolol e (-)- α -neoclaveno, para além da sua disponibilidade em laboratório, teve-se em conta a sua estrutura e os grupos substituintes. Até ao momento, nenhum destes três sesquiterpenóides foi identificado nas variedades de *Vitis vinifera* L.

A toxicidade dos compostos sesquiterpénicos foi estudada usando duas estirpes de *S. typhimurium his⁻*, a TA98 e TA100, sem e com activação metabólica. Os critérios usados para avaliar uma resposta positiva ao mútagénico foram: i) uma relação clara entre o aumento do número de revertentes e a concentração de composto num intervalo de concentrações não-tóxicas

[44] e ii) número colónias revertentes superior ao dobro do número médio de colónias revertentes contabilizadas no controlo [45, 46].

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para a avaliação da toxicidade e mutagenicidade dos compostos sesquiterpénicos, apresentados sob a forma de média de revertentes e o respectivo desvio padrão.

Este estudo iniciou-se com uma gama de massas entre as 14 e 222 µg/placa para os compostos *trans*-farnesol, nerolidol, *cis*-nerolidol e α-bisabolol, entre as 13 e 204 µg/placa para os compostos valenceno, *trans*-cariofileno, (-)-α-neoclaveno, (+)-aromadendreno e α-cedreno e entre as 12 e 198 µg/placa para o guaiazuleno.

Da observação da Tabela 9, verifica-se que para a estirpe TA98 quer com ou sem activação metabólica no intervalo de massas consideradas para os diferentes compostos, não há nem aumento nem diminuição significativa ($p < 0,05$) do número de revertentes quando comparados com o controlo negativo.

Para a estirpe TA100 sem activação metabólica, observou-se que para os compostos *cis*-nerolidol, valenceno, *trans*-cariofileno, (-)-α-neoclaveno, (+)-aromadendreno e α-cedreno também não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao controlo negativo. No entanto, para o *trans*-farnesol, nerolidol e α-bisabolol, já se observa uma redução significativa do número de revertentes ($p > 0,05$) relativamente ao controlo negativo para o intervalo de massas considerado. Quando se verifica uma redução significativa do número de revertentes, quer dizer que estes compostos para essas massas apresentam um efeito tóxico sobre a estirpe bacteriana. Assim, a toxicidade é perceptível quando se verifica uma redução significativa no número de colónias com mutação reversa das bactérias *his*⁺ [63, 64].

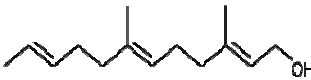

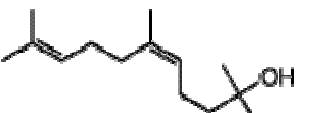
Neste sentido, foi estabelecido um intervalo de massas inferior ao referido anteriormente para estes três compostos. O intervalo de massa estabelecido foi então entre as 0,9 e 7 µg/placa. Neste intervalo já não se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o número de revertentes das amostras e do controlo negativo.

Já com activação metabólica, a estirpe TA100 não apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), para os 10 sesquiterpenóides testados. Quer isto dizer, que a adição da mistura S9 reduz a indução de toxicidade para a estirpe TA100, para os compostos que na ausência da mistura S9 apresentam toxicidade (Tabela 9).

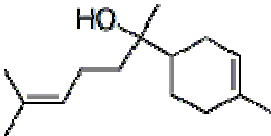
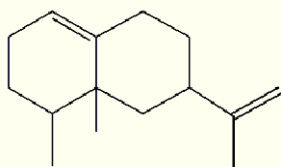
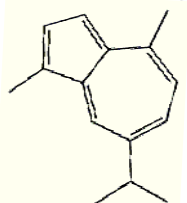
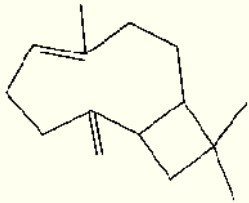
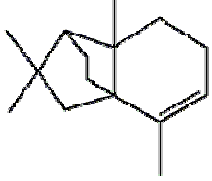
Para o nerolidol, para as massas de 14 e 28 µg/placa, e o (-)-α-neoclaveno para as massas de 26 e 51 µg/placa para a TA100 com activação metabólica, não foram observadas colónias de revertentes. No entanto, para as massas superiores já se contabilizaram colónias revertentes sem diferenças significativas relativamente ao controlo negativo. Quer isto dizer, que provavelmente para os compostos referidos para as respectivas massas não foi adicionada bactéria durante a preparação do ensaio.

3. Resultados e Discussão

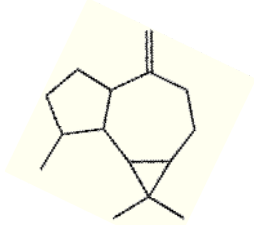
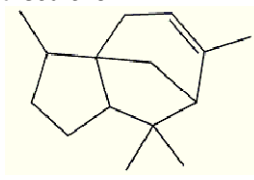
Tabela 9. Avaliação da toxicidade dos dez sesquiterpenóides em estudo para a *Salmonella typhimurium* his⁻, para as estirpes TA98 e TA100 sem (-S9) e com (+S9) activação metabólica.

Composto	µg/placa	Número de revertentes (média ± DEVP) ^a			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
trans-Farnesol 	222	8 ± 4	12 ± 9	5 ± 4*	214 ± 28
	111	11 ± 1	7 ± 4	19 ± 7*	227 ± 3
	56	7 ± 0	10 ± 3	71 ± 14*	196 ± 4
	28	7 ± 4	12 ± 3	338 ± 212*	210 ± 17
	14	6 ± 2	15 ± 3	173 ± 103*	229 ± 32
	0	12 ± 2	10 ± 2	228 ± 19	183 ± 27
	CP ^b	304 ± 73	NC ^c	338 ± 13	602 ± 28
	7	- ^d	-	62 ± 3	-
	3.5	-	-	65 ± 6	-
	1.7	-	-	85 ± 19	-
	0.9	-	-	79 ± 11	-
	0	-	-	82 ± 10	-
	CP	-	-	716 ± 233	-
Nerolidol (mistura de isómeros <i>trans</i> e <i>cis</i>) 	222	19 ± 5	12 ± 5	65 ± 8*	74 ± 7
	111	15 ± 6	10 ± 3	63 ± 8*	67 ± 25
	56	19 ± 6	14 ± 2	0 ± 0*	61 ± 13
	28	18 ± 7	12 ± 1	43 ± 5*	0 ± 0
	14	20 ± 4	10 ± 3	43 ± 5*	0 ± 0
	0	32 ± 6	10 ± 2	156 ± 10	76 ± 14
	CP	428 ± 133	NC	410 ± 67	408 ± 77
	7	-	-	458 ± 262	-
	3.5	-	-	328 ± 128	-
	1.7	-	-	381 ± 25	-
	0.9	-	-	288 ± 64	-
	0	-	-	487 ± 96	-
	CP	-	-	NC	-
cis-Nerolidol 	222	10 ± 5	10 ± 1	91 ± 8	216 ± 10
	111	8 ± 2	8 ± 5	95 ± 19	217 ± 27
	56	11 ± 3	14 ± 5	99 ± 5	200 ± 40
	28	8 ± 3	13 ± 7	86 ± 13	229 ± 7
	14	8 ± 3	4 ± 6	88 ± 14	223 ± 9
	0	12 ± 2	8 ± 4	105 ± 6	183 ± 27
	CP	304 ± 73	17 ± 11	NC	602 ± 28

3. Resultados e Discussão

Composto	$\mu\text{g/placa}$	Número de revertentes (média \pm DEVP) ^a			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
α-Bisabolol 	222	4 \pm 2	7 \pm 6	2 \pm 3*	191 \pm 16
	111	8 \pm 3	6 \pm 5	0 \pm 0*	174 \pm 27
	56	10 \pm 1	4 \pm 7	22 \pm 39*	183 \pm 28
	28	7 \pm 6	10 \pm 1	7 \pm 3*	188 \pm 15
	14	7 \pm 2	7 \pm 6	5 \pm 3*	217 \pm 7
	0	12 \pm 2	9 \pm 4	228 \pm 19	183 \pm 27
	CP	304 \pm 73	17 \pm 11	338 \pm 13	602 \pm 28
	7	-	-	348 \pm 76	-
	3.5	-	-	331 \pm 121	-
	1.7	-	-	312 \pm 63	-
	0.9	-	-	366 \pm 180	-
	0	-	-	487 \pm 96	-
	CP	-	-	NC	-
Valenceno 	204	27 \pm 14	11 \pm 6	120 \pm 14	122 \pm 11
	102	27 \pm 9	12 \pm 3	108 \pm 8	112 \pm 21
	51	27 \pm 9	13 \pm 5	120 \pm 10	113 \pm 10
	26	20 \pm 3	13 \pm 2	111 \pm 31	134 \pm 1
	13	27 \pm 8	11 \pm 1	119 \pm 10	139 \pm 14
	0	32 \pm 6	10 \pm 2	105 \pm 6	131 \pm 6
	CP	428 \pm 133	NC	NC	NC
Guaiazuleno 	198	23 \pm 5	13 \pm 3	123 \pm 24	68 \pm 7
	99	18 \pm 6	18 \pm 3	113 \pm 32	86 \pm 7
	50	18 \pm 1	14 \pm 4	93 \pm 5	73 \pm 2
	25	22 \pm 10	16 \pm 4	104 \pm 10	68 \pm 9
	12	19 \pm 6	14 \pm 2	117 \pm 21	62 \pm 5
	0	32 \pm 6	10 \pm 2	105 \pm 6	76 \pm 14
	CP	428 \pm 133	NC	NC	408 \pm 68
trans-Cariofileno 	204	9 \pm 4	12 \pm 3	116 \pm 18	237 \pm 29
	102	11 \pm 4	9 \pm 4	112 \pm 7	216 \pm 5
	51	11 \pm 2	11 \pm 1	115 \pm 20	224 \pm 10
	26	9 \pm 2	15 \pm 4	124 \pm 5	196 \pm 22
	13	12 \pm 1	9 \pm 2	113 \pm 25	214 \pm 21
	0	12 \pm 2	10 \pm 2	105 \pm 6	183 \pm 27
	CP	304 \pm 73	NC	NC	602 \pm 28
(-)-α-Neocloveno 	204	6 \pm 2	11 \pm 4	115 \pm 26	187 \pm 36
	102	6 \pm 5	14 \pm 1	99 \pm 9	184 \pm 15
	51	5 \pm 2	16 \pm 6	121 \pm 14	0 \pm 0
	26	10 \pm 1	9 \pm 2	96 \pm 27	0 \pm 0
	13	12 \pm 2	13 \pm 2	100 \pm 33	175 \pm 30
	0	8 \pm 1	10 \pm 2	105 \pm 6	183 \pm 27
	CP	NC	NC	NC	402 \pm 27

3. Resultados e Discussão

Composto	$\mu\text{g/placa}$	Número de revertentes (média \pm DEVP) ^a			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
(+)-Aromadendreno 	204	12 \pm 3	10 \pm 3	130 \pm 2	151 \pm 20
	102	13 \pm 3	12 \pm 1	129 \pm 25	127 \pm 30
	51	12 \pm 2	11 \pm 5	130 \pm 30	114 \pm 29
	26	9 \pm 2	9 \pm 3	130 \pm 22	129 \pm 9
	13	12 \pm 7	15 \pm 4	141 \pm 16	120 \pm 104
	0	12 \pm 2	10 \pm 2	131 \pm 6	183 \pm 27
	CP	304 \pm 73	NC	1446 \pm 230	602 \pm 28
α-Cedreno 	204	9 \pm 8	13 \pm 2	158 \pm 90	209 \pm 34
	102	15 \pm 2	12 \pm 4	233 \pm 57	159 \pm 49
	51	14 \pm 3	11 \pm 3	252 \pm 52	148 \pm 15
	26	10 \pm 2	14 \pm 1	201 \pm 14	157 \pm 12
	13	9 \pm 3	14 \pm 5	292 \pm 79	213 \pm 25
	0	12 \pm 2	10 \pm 2	351 \pm 15	183 \pm 27
	CP	304 \pm 73	NC	228 \pm 19	602 \pm 28

^a Valores são a média \pm DEVP de três placas

^b CP – controlo positivo: para TA 100/-S9, nitrofurantoína (10 $\mu\text{g/placa}$); TA 98/-S9, 2-nitrofluoreno (10 $\mu\text{g/placa}$); TA100 e TA 98/+S9, 2-aminoantraceno (10 $\mu\text{g/placa}$).

^c Não contabilizado

^d Concentração não testados, porque não foi observada toxicidade para as concentrações mais elevadas

Dose 0 – controlo negativo (solvente: 50 μL etanol p.a.)

* Valores significativamente diferentes do controlo negativo ($p < 0.05$), $n=3$

Assim, constata-se que a estirpe TA98 não apresenta toxicidade, uma vez que não se verificou a redução significativa do número de revertentes para nenhum dos compostos, quer para a estirpe sem ou com activação metabólica nesta gama de massas (Tabela 9). Por outro lado, a estirpe TA100 sem activação metabólica é mais susceptível à indução de toxicidade por parte dos compostos nerolidol, α -bisabolol e *trans*-farnesol na gama de massas entre as 7 a 222 $\mu\text{g/placa}$, sendo que com activação metabólica os sesquiterpenóides não apresentam efeito tóxico para a mesma estirpe.

Relativamente ao efeito mutagénico, este não pode ser avaliado na presença de toxicidade para a estirpe que está a ser testada. Desta forma, tem de se seleccionar uma gama de massas previamente determinada dentro do intervalo de massas não-tóxicas [63].

Assim, uma vez que para se estudar a toxicidade destes compostos já se estabeleceram intervalos de massas, para os quais não se observam efeitos tóxicos, esses resultados podem ser usados para se avaliar a mutagenicidade desses mesmos compostos. De acordo com isto, construíram-se curvas de massa - resposta, com o número de revertentes (média das três réplicas) em função da massa (expressa em $\mu\text{g/placa}$) para os diferentes compostos.

As figuras 14 e 15 apresentam as curvas massa de sesquiterpenóide/placa – nº de revertentes/placa e as linhas da regressão linear para a estirpe TA 98 sem e com activação metabólica, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

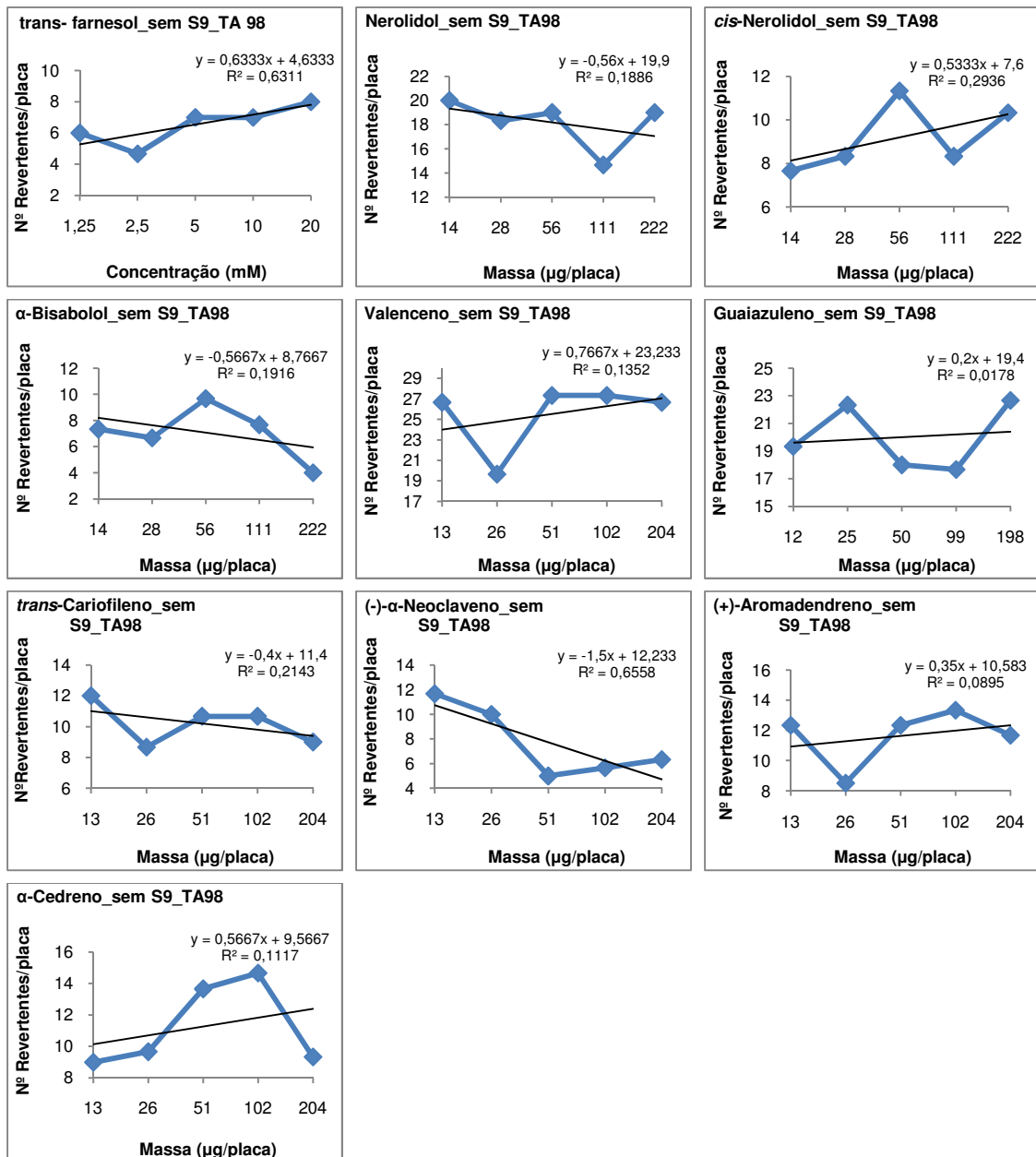


Figura 14. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA98 sem activação metabólica (sem S9).

3. Resultados e Discussão

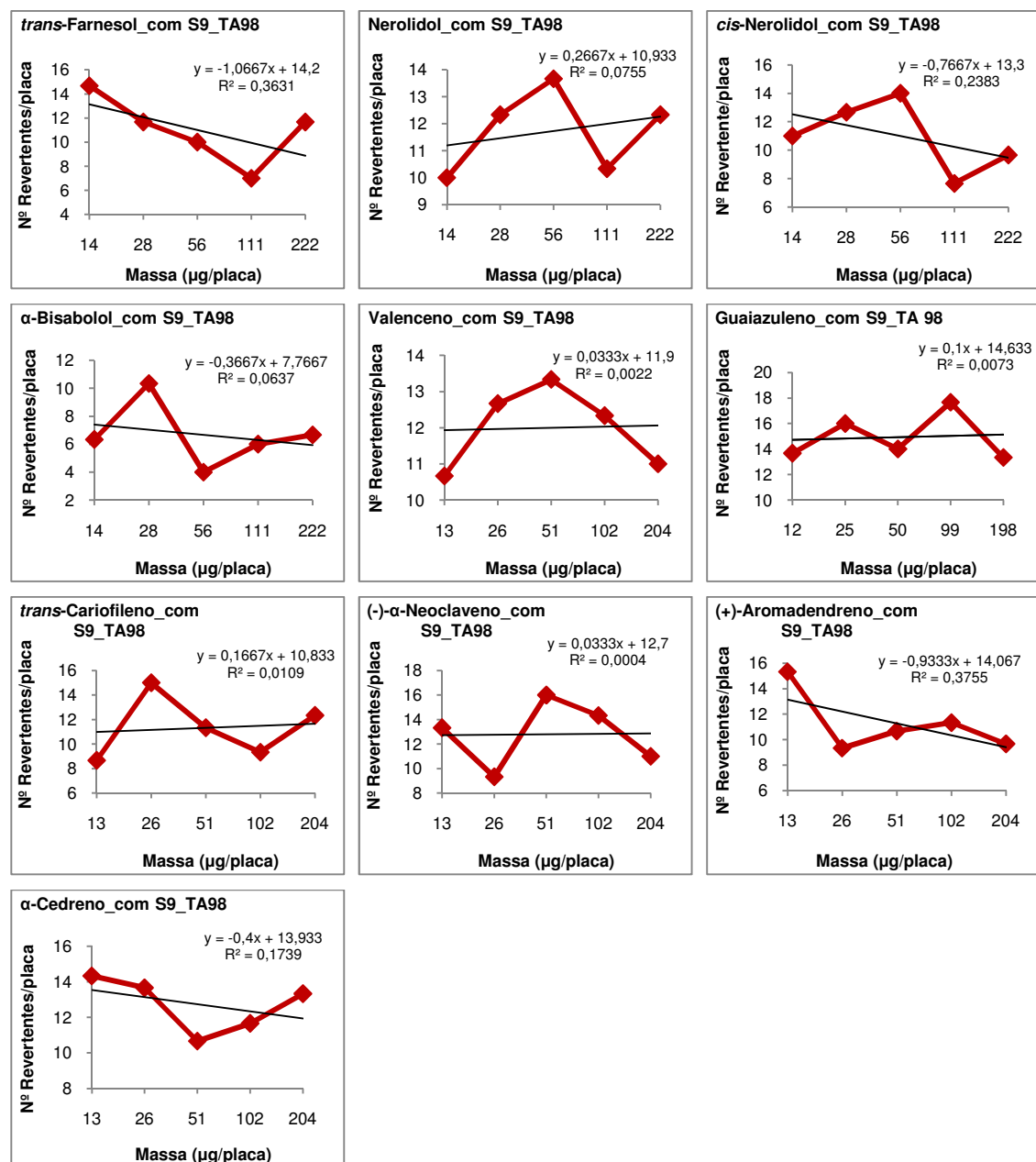


Figura 15. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA98 com activação metabólica (com S9).

Pelas representações gráficas e respectivas linhas de linearidade pode verificar-se que não há uma relação de linearidade entre o número de revertentes e a massa de sesquiterpenóides. Pode então afirmar-se que estes compostos sesquiterpénicos não induzem mutagenicidade, sendo tal facto visível pelos R^2 que variam entre os 0,0178-0,6558 para a TA 98 sem activação metabólica, e os 0,0004-0,3755 para a TA 98 com activação metabólica.

À semelhança do que acontece com a estirpe TA98, também para a TA100 se representaram as curvas massa de sesquiterpenóide/placa – nº de revertentes/placa e respectivas

3. Resultados e Discussão

linhas de regressão linear (Figura 16 e Figura 17), com exceção do nerolidol e do (-)- α -neoclaveno, por estes só possuírem três massas. Mais uma vez, estes compostos não induzem mutagenicidade, quer na ausência (R^2 entre 0,0004-0,6982) como na presença (R^2 entre 0,0012-0,5423) da mistura de S9.

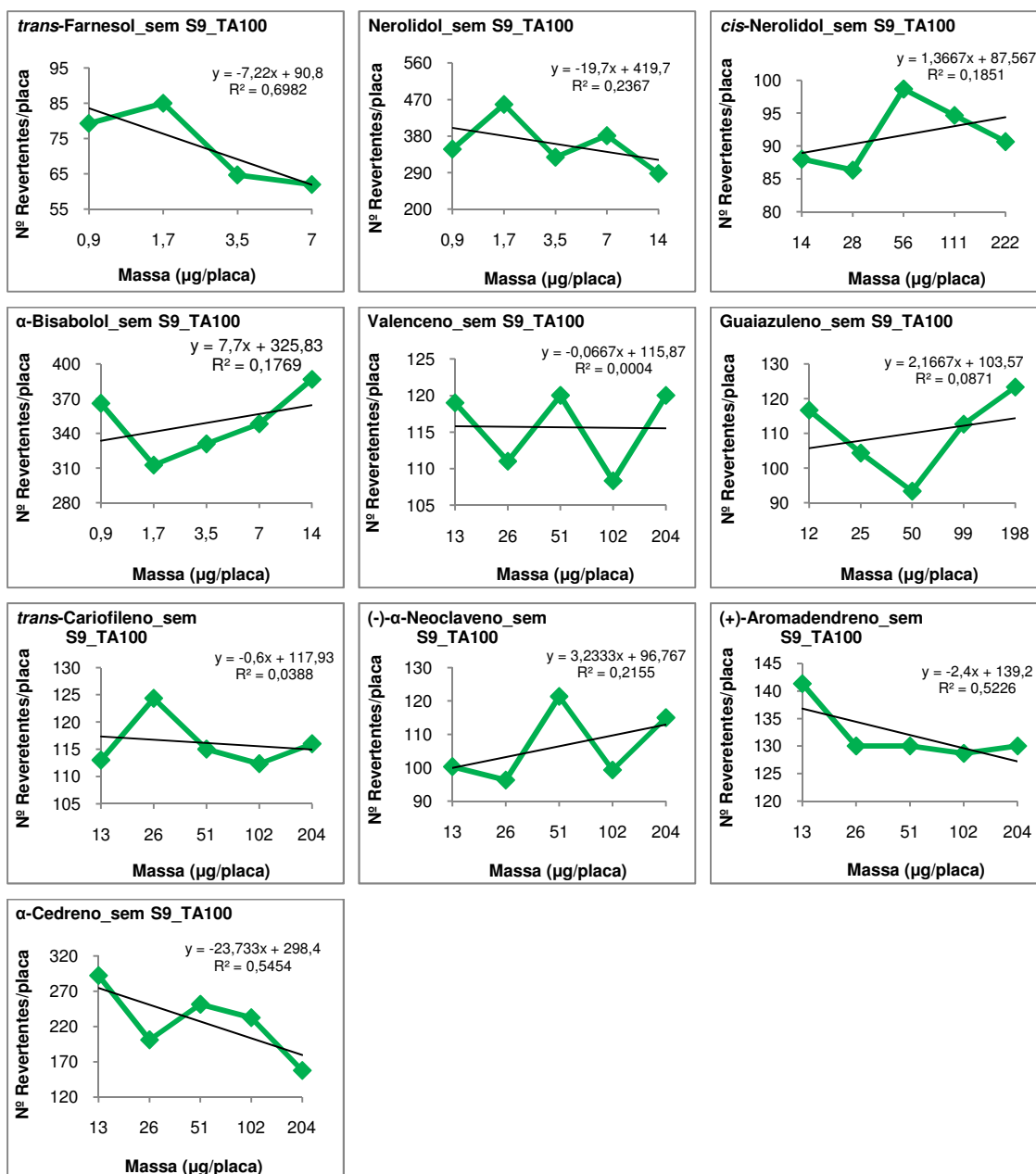


Figura 16. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA100 sem activação metabólica (sem S9).

3. Resultados e Discussão

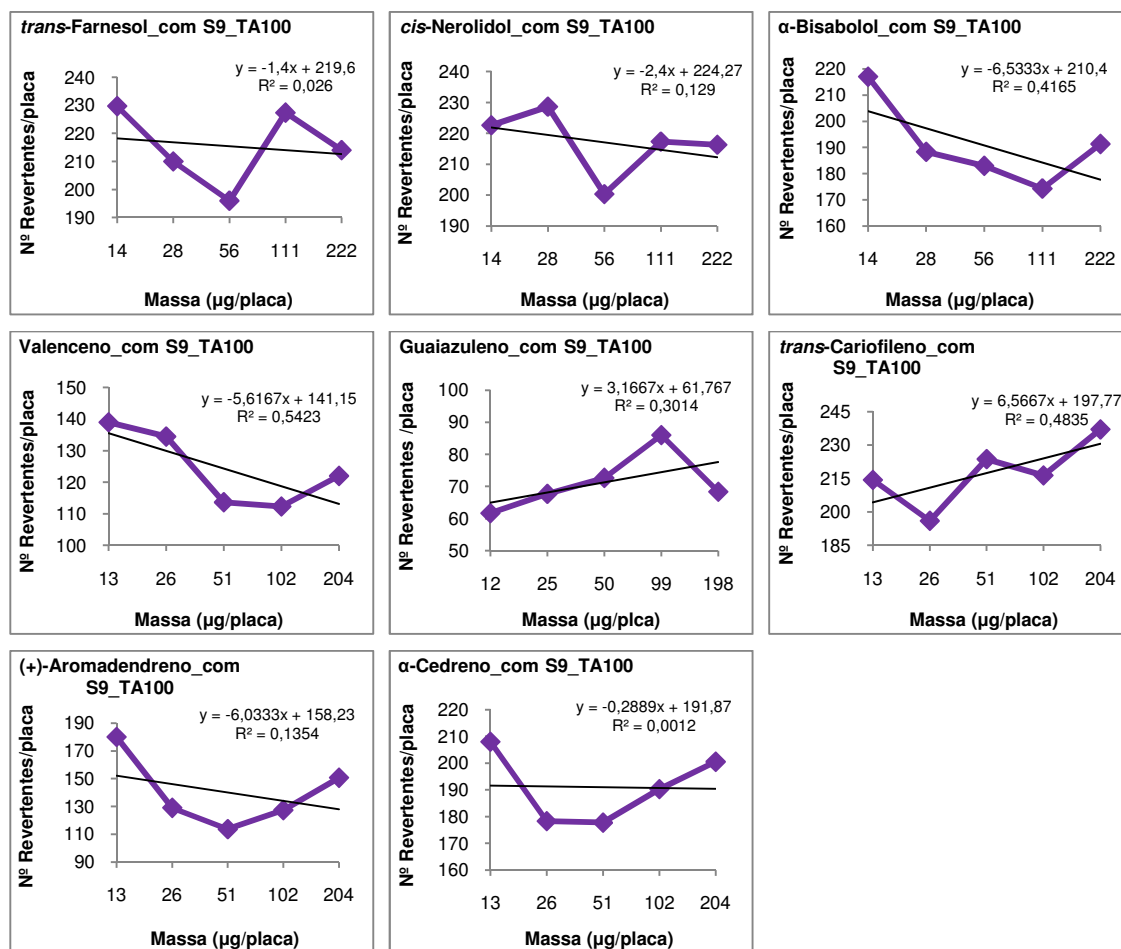


Figura 17. Representação gráfica do número médio de revertentes por placa, em função das diferentes massas de sesquiterpenóide, para a estirpe bacteriana TA 100 com activação metabólica (com S9).

Para os compostos nerolidol e o (-)-α-neoclaveno os resultados da mutagenicidade são avaliados recorrendo ao controlo negativo, onde se verifica a inexistência de um número de revertentes superior ao dobro do número de revertentes contabilizados no controlo negativo, para as diferentes massas de composto (Tabela 9). Assim, de acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que os compostos sesquiterpénicos em estudo não apresentam mutagenicidade.

Na literatura não existe informação relativamente à toxicidade ou mutagenicidade dos compostos sesquiterpénicos, com excepção do α-bisabolol. Num estudo prévio, Carneiro *et al.*[63] estudaram a toxicidade do α-bisabolol para a estirpe TA100, a fim de determinarem a gama de massa a usar no estudo da actividade mutagénica para as estirpes TA98, TA100, TA97a e TA1535.

No que respeita à toxicidade, constataram que o α-bisabolol apresenta um efeito tóxico na gama das 150 a 5000 µg/placa na ausência de activação metabólica e na gama das 200 a 500 µg/placa com activação metabólica para a estirpe TA100.

3. Resultados e Discussão

Comparando estes resultados com os obtidos neste trabalho, existe consistência entre ambos quando na ausência de ativação metabólica. Com ativação metabólica, os resultados são contraditórios, pois no presente estudo para uma massa de 222 µg/placa o α-bisabolol não apresenta toxicidade. No estudo realizado por Carneiro *et al.*[63], o α-bisabolol já apresenta um efeito tóxico para as 200 µg/placa.

Quanto à mutagenicidade, concluíram que o α-bisabolol não é mutagênico para as estirpes TA98, TA100, TA97a e TA1535, sendo esta conclusão consistente com os resultados obtidos no presente estudo com as estirpes TA98 e TA100.

A Tabela 10 apresenta de forma resumida os resultados obtidos para estudo da toxicidade, para cada composto nos intervalos de massas consideradas. Daqui, conclui-se que o guaiazuleno para uma massa igual ou inferior a 198 µg/placa, o nerolidol, o *cis*-nerolidol e α-bisabolol (massa ≤ 222 µg/placa) e (-)-α-neoclaveno, valenceno, (+)-aromadendreno, *trans*-cariofileno e α-cedreno (massa ≤ 204 µg/placa) não apresentam toxicidade, para a estirpe TA98 sem e com ativação metabólica. Enquanto, que para a estirpe TA100 sem ativação metabólica o *trans*-farnesol, α-bisabolol e nerolidol apresentam efeito tóxico para as massas entre as 14 e 222 µg/placa. Para os restantes compostos, bem como para a estirpe com ativação metabólica, não exercem efeito tóxico sobre a estirpe bacteriana.

Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos para teste de Ames.

Composto	Ausência (-) e presença (+) de toxicidade									
	TA98			TA100						
	sem S9 e com S9			sem S9				com S9		
	µg/placa			µg/placa				µg/placa		
	14-222	13-204	12-198	14-222	13-204	12-198	0,9-7	14-222	13-204	12-198
<i>trans</i> -Farnesol	-			+			-	-		
Nerolidol	-			+			-	-		
<i>cis</i> – Nerolidol	-			-				-		
α-Bisabolol	-			+			-	-		
Valenceno		-			-				-	
Guaiazuleno			-			-				-
<i>trans</i> – Cariofileno		-			-				-	
(-)-α-Neoclaveno		-			-				-	
(+)-Aromadendreno		-			-				-	
α-Cedreno		-			-				-	

+ - Apresenta toxicidade

- - Não apresenta toxicidade

3.3. Avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na actividade antimicrobiana de antibióticos

Com os intervalos de massas estabelecidos na etapa anterior (secção 3.2), procedeu-se à avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na actividade antimicrobiana de alguns antibióticos. Para este teste foram seleccionadas duas bactérias, uma Gram negativo, *E. coli* e uma Gram positivo, *S. aureus*.

As bactérias de Gram positivo e negativo diferem essencialmente na composição da parede celular. Nas bactérias de Gram negativo a camada de peptidoglicana é mais fina, possuem uma membrana externa e um espaço periplasmático. As bactérias de Gram positivo possuem uma camada espessa de peptidoglicana e não possuem membrana externa [75]. As bactérias variam na composição lipídica das suas membranas e é, portanto, de esperar que apresentem diferentes sensibilidades aos compostos antimicrobianos utilizados [65].

Um antibiótico que seja eficaz nos dois grupos de bactérias é referido como sendo de espectro alargado [52].

Neste estudo, foram usados oito antibióticos que representam famílias de compostos de importância clínica, tais como as tetraciclina (tetraciclina), β -lactâmico/ β -lactamase (amoxicilina/ác. clavulânico), cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima), macrólidos (eritromicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), β -lactâmicos (penicilina G), carbapenemos (imipenemo) e aminoglicosídeos (vancomicina) foram testados isoladamente na presença e ausência (controlo) de 10 sesquiterpenóides.

As Tabela 11 e 12 apresentam os resultados obtidos.

A bactéria *S. aureus* com os antibióticos ceftadizima a uma concentração de 30 μ g (CAZ 30), eritromicina a uma concentração de 10 μ g (E 10), ciprofloxacina a uma concentração de 5 μ g (CIP 5) e penicilina G a uma concentração de 10 μ g (P 10), quer na presença como na ausência (controlo) dos sesquiterpenóides não apresenta halo de inibição. Quer isto dizer, que a bactéria apresenta resistência a estes antibióticos.

O mesmo acontece para a *E. coli*, para os antibióticos tetraciclina com uma concentração 10 μ g (E 10) e CIP 5 quer na presença como na ausência (controlo) dos sesquiterpenóides.

A vancomicina com concentração de 30 μ g (VA 30) na presença dos sesquiterpenóides apresenta um diâmetro do halo de inibição igual ao do controlo (antibiótico sem sesquiterpenóides), sugerindo que estes compostos não aumentam a susceptibilidade da *E. coli* ao antibiótico.

3. Resultados e Discussão

Tabela 11. Média do diâmetro dos halos de inibição observados para *S. aureus* no ensaio de difusão em placa de agar.

Composto	µg/placa	Diâmetro do halo de inibição (mm) (média ± DEVP)							
		<i>S.aureus</i>							
		Antibiótico							
		TE 10	AMC 30	CAZ 30	E 10	CIP 5	P 10	IMP 10	VA 30
<i>trans</i> -Farnesol	7	20,0±1,0*	12,6±2,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	9,0±7,9	19,0±1,7
	3,5	20,0±0,0*	11,6±1,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	7,0±6,0	18,0±0,0
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6
Nerolidol	7	21,6±0,6*	13,0±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,3±1,0	18,3±0,6*
	3,5	21,3±0,6*	12,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,6±0,6	18,0±0,0*
	0	20,0±0,0	14,6±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	17,0±0,0
<i>cis</i> -Nerolidol	222	^a	17,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±0,0*	^a
	55,5	22,6±0,6*	14,0±1,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	13,6±2,3*	21,0±1,0*
	3,5	22,6±,6*	11,6±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	22,0±0,0*
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6
α -Bisabolol	7	20,3±0,6	14,6±2,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±0,7*	17,7±0,6
	3,5	20,6±0,6	13,6±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	8,3±0,6*	18,0±1,0
	0	20,0±0,0	14,6±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	17,0±0,0
Valenceno	204	25,0±0,0*	23,0±4,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	36,6±8,5*	22,7±0,6*
	51	22,0±0,0*	16,6±1,5*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	23,0±2,6*	20,0±0,0*
	3,3	21,3±1,5*	15,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	17,3±3,2*	19,7±0,6*
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6
Guaiazuleno	198	23,6±0,6*	20,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,6±0,6*	22,6±6,7*	20,3±0,6*
	50	20,0±0,0	12,6±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	13,0±1,7	17,3±0,6
	3	20,0±0,0	17,3±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±1,0	17,3±0,6
	0	20,0±0,0	14,6±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	17,0±0,0
<i>trans</i> -Cariofileno	204	23,6±0,6*	17,6±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,3±1,2*	28,6±5,0*	19,7±0,6*
	51	22,0±0,0*	14,6±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	20,6±1,2*	18,0±1,0
	3,3	20,0±0,0	14,6±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±1,0	18,0±0,0
	0	20,0±0,0	14,6±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	17,0±0,0
(-)- α -Neoclaveno	204	20,6±0,6*	15,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	6,7±0,5	18,3±0,6*
	51	20,0±0,0*	13,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	18,3±0,6*
	3,3	20,0±0,0*	11,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	3,3±5,7	17,7±0,6
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6
(+) -Aromadendreno	204	20,0±2,0	13,0±6,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	19,5±13,4*	16,7±4,9
	51	17,0±1,7	10,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0±1,0
	3,3	-	10,3±1,5	0,0±0,0	0,0±0,0	-	-	0,0±0,0	-
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6
α -Cedreno	204	22,3±2,5*	12,0±1,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	8,6±7,5	19,0±1,0*
	51	21,0±2,8*	10,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	17,0±1,4
	3,3	16,0±1,0	11,3±1,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,5±0,7
	0	18,3±0,6	11,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	16,3±0,6

* Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0.05$), $n = 3$; ^a Não houve crescimento de bactéria; **Dose 0** – controle negativo (disco de antibiótico sem sesquiterpenóide). **TE 10** - Tetraciclina a uma concentração de 10 µg; **AMC 30** - Amoxicilina/ Ác. Clavulânico a uma concentração de 30 µg; **CAZ 30** -Ceftadizina a uma concentração de 30 µg; **E 10** - Eritromicina a uma concentração de 10 µg; **CIP 5** - Ciprofloxacina a uma concentração de 5 µg; **P 10** - Penicilina G a uma concentração de 10 µg; **IMP 10** - Imipenemo a uma concentração de 10 µg; **VA 30** - Vancomicina a uma concentração de 30 µg.

3. Resultados e Discussão

Tabela 12. Média do diâmetro dos halos de inibição observados para *E. coli* no teste de difusão em placa de agar.

Composto	µg/placa	Diâmetro do halo de inibição (mm) (média ± DEVP)							
		<i>E. coli</i>							
		Antibiótico							
		TE 10	AMC 30	CAZ 30	E 10	CIP 5	P 10	IMP 10	VA 30
<i>trans</i> -Farnesol	7	0,0±0,0	17,7±0,6	20,7±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±1,7	10,0±0,0
	3,5	0,0±0,0	17,7±0,6	20,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,7±0,6	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
Nerolidol	7	0,0±0,0	20,0±0,0*	24,7±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,0±1,0	10,0±0,0
	3,5	0,0±0,0	17,5±2,1	21,5±0,7*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±1,4	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
<i>cis</i> -Nerolidol	222	0,0±0,0	18,0±0,0	20,0±2,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	34,3±0,6	10,0±0,0
	55,5	0,0±0,0	16,3±1,2	19,0±1,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±1,7	10,0±0,0
	3,5	0,0±0,0	15,7±0,6	16,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,3±1,2	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
α -Bisabolol	7	0,0±0,0	18,6±1,2*	20,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	34,3±1,2	10,0±0,0
	3,5	0,0±0,0	17,0±0,0	20,7±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,3±2,5	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
Valenceno	204	0,0±0,0	18,7±0,6*	22,3±2,3*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	34,7±5,1	10,0±0,0
	51	0,0±0,0	17,7±0,6	20,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±2,0	10,0±0,0
	3,3	0,0±0,0	17,0±0,0	21,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,0±1,7	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
Guaiazuleno	198	0,0±0,0	14,0±1,0	11,7±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,0±1,0	10,0±0,0
	50	0,0±0,0	13,7±1,5	12,3±2,1*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0±3,5	10,0±0,0
	3	0,0±0,0	15,7±2,1	13,0±4,4*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,3±1,2	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
<i>trans</i> -Cariofileno	204	0,0±0,0	14,0±0,0*	12,3±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,0±1,0*	10,0±0,0
	51	0,0±0,0	14,0±0,0*	13,3±1,5*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	30,3±0,6*	10,0±0,0
	3,3	0,0±0,0	14,7±0,6*	13,0±1,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	31,0±1,0*	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
(-)- α -Neoclaveno	204	0,0±0,0	17,5±0,7	20,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,3 ± 2,5	10,0±0,0
	51	0,0±0,0	4,0±4,2*	18,3±1,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,3 ± 2,1	10,0±0,0
	3,3	0,0±0,0	17,0±0,0	18,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	34,0 ± 1,7	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
(+) -Aromadendreno	204	0,0±0,0	15,7±0,6*	15,3±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,0 ± 1,7	10,0±0,0
	51	0,0±0,0	15,0±0,0*	14,3±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	30,7 ± 1,2	10,0±0,0
	3,3	0,0±0,0	15,0±0,0*	16,0±2,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,3 ± 2,3	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0
α -Cedreno	204	0,0±0,0	12,7±0,6*	10,7±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	27,7±0,6*	10,0±0,0
	51	0,0±0,0	12,7±0,6*	11,0±0,0*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	27,7±0,6*	10,0±0,0
	3,3	0,0±0,0	15,0±2,6	10,7±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	28,7±1,2*	10,0±0,0
	0	0,0±0,0	16,7±0,6	18,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	33,7±1,2	10,0±0,0

* Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0.05$), $n=3$; ^a Não houve crescimento de bactéria; **Dose 0** – controle negativo (disco de antibiótico sem sesquiterpenóide). **TE 10** - Tetraciclina a uma concentração de 10 µg; **AMC 30** - Amoxicilina/ Ác. Clavulânico a uma concentração de 30 µg; **CAZ 30** -Ceftadizina a uma concentração de 30 µg; **E 10** - Eritromicina a uma concentração de 10 µg; **CIP 5** - Ciprofloxacina a uma concentração de 5 µg; **P 10** - Penicilina G a uma concentração de 10 µg; **IMP 10** - Imipenemo a uma concentração de 10 µg; **VA 30** - Vancomicina a uma concentração de 30 µg.

Das tabelas 11 e 12 verifica-se ainda o seguinte:

- *trans*-Farnesol

Para a bactéria *S. aureus*, a TE 10 na presença do *trans*-farnesol apresenta um aumento do halo de inibição, comparativamente ao controlo negativo. Este resultado é estatisticamente significativo para $p < 0,05$. O amoxiciclina/ác. clavulâmico com uma concentração 30 µg (AMC 30), imipenemo a uma concentração 10 µg (IMP 10) e a VA 30, na presença deste sesquiterpenóide apresentam um aumento do diâmetro do halo de inibição, não sendo este estatisticamente significativo, $p > 0,05$.

No caso da *E. coli*, os antibióticos AMC 30, CAZ 30 na presença deste composto também apresentam um aumento do diâmetro do halo de inibição, contudo, este não é significativo ($p > 0,05$). Com o IMP 10 há uma diminuição do halo de inibição não sendo também este significativo ($p > 0,05$).

- Nerolidol

Os antibióticos TE 10 e a VA 30 na presença do nerolidol (3,5 e 7 µg/placa) testados em *S. aureus*, e o AMC 30 com 7 µg deste composto e a CAZ 30 com 3,5 e 7 µg/placa em *E. coli*, mostram um aumento do diâmetro do halo de inibição, reflectindo o aumento da actividade destes antibióticos sobre as respectivas bactérias ($p < 0,05$). O IMP 10 na presença do nerolidol não apresenta um aumento do diâmetro do halo de inibição ($p > 0,05$) para ambas as bactérias.

- *cis*-Nerolidol

A TE 10 e a VA 30 para as 55,5 e 3,3 µg/placa de *cis*-nerolidol e para os antibióticos AMC 30 e o imipenemo a uma concentração 10 µg (IMP 10) na presença de 55,5 e 222 µg/placa do mesmo composto apresentam um aumento do diâmetro do halo de inibição contra *S. aureus* ($p < 0,05$). Já para *E. coli* não se verificou nenhum aumento significativo na susceptibilidade aos antibióticos AMC 30, CAZ 30 e IMP 10 ($p > 0,05$).

- α -Bisabolol

O IMP 10 vê o seu efeito antimicrobiano aumentado na presença de 3,5 e 7 µg/placa do sesquiterpenóide α -bisabolol quando testado contra *S. aureus*. Já a TE 10, AMC 30 e a VA 30 não manifestam um aumento significativo do diâmetro do halo de inibição. A *E. coli* mostra maior susceptibilidade ao antibiótico AMC 30 na presença de 7 µg/placa e ao CAZ 30 (3,5 e 7 µg/placa) deste composto ($p < 0,05$).

- Valenceno

Os antibióticos TE 10, IMP 10, VA 30 e AMC 30 na presença de 3,3, 50 e 204 µg/placa de valenceno, testados contra *S. aureus*, bem como o AMC 30 e CAZ 30 (204

µg/placa) na presença de valenceno testados contra a *E.coli* apresentam um aumento do efeito dos respectivos antibióticos ($p<0,05$). O IMP 10 por sua vez não apresenta um aumento significativo ($p>0,05$) do halo de inibição.

- Guaiazuleno

O AMC 30 na presença de 3, 50 e 198 µg/placa de sesquiterpenóide, o TE 10, IMP 10, VA 30 e a P 10 para 198 µg de guaiazuleno mostram um aumento do diâmetro do halo de inibição estatisticamente significativo ($p<0,05$), quando testados contra *S. aureus*. Relativamente à *E.coli*, observa-se a diminuição do diâmetro do halo de inibição estatisticamente significativa ($p>0,05$) para o antibiótico CAZ 30. Para os antibióticos AMC 30 e IMP 10 também se observa uma diminuição do halo de inibição, não sendo esta significativa ($p>0,05$).

- *trans*-Cariofileno

A aplicação dos antibióticos AMC 30, P 10 e VA 30 na presença das massas de 204 e 51 µg/placa e os antibióticos TE 10 e IMP 10 (51 e 204 µg/placa) de *trans*-cariofileno, apresentaram um aumento do efeito dos antibióticos contra *S. aureus* ($p<0,05$).

- (-)- α -Neoclaveno

TE 10 quando na presença de 3,3, 51 e 204 µg/placa de (-)- α -neoclaveno, AMC 30 (204 µg/placa de sesquiterpenóide) e VA 30 (51 e 204 µg/placa de sesquiterpenóide) também reflectem um aumento do efeito antimicrobiano ($p<0,05$).

- (+)-Aromadendreno e α -Cedreno

O (+)-aromadendreno (204 µg/placa) promove o aumento do efeito do IMP 10 quando aplicado para estudar a sensibilidade da *S. aureus* ($p<0,05$). No entanto, os antibióticos TE 10, AMC 30 e VA 30, não manifestam um aumento do diâmetro do halo de inibição ($p>0,05$). O mesmo acontece para o AMC 30 e IMP 10 na presença de α -cedreno. Já a TE 10 (3,3, 51 e 204 µg/placa) e a VA 30 (204 µg/placa) vêm o seu efeito potenciado na presença do α -cedreno.

Os antibióticos AMC 30, CAZ 30 e IMP 10 na presença dos sesquiterpenóides *trans*-cariofileno, (+)-aromadendreno e do α -cedreno, quando aplicados para avaliar a susceptibilidade da bactéria *E. coli* apresentam uma redução significativa ($p<0,05$) do diâmetro do halo de inibição.

O aumento do diâmetro do halo de inibição, traduz-se num aumento do efeito dos antibióticos sobre as respectivas bactérias, quando na presença dos sesquiterpenóides em questão.

É possível averiguar pelos resultados descritos anteriormente, que a resistência da bactéria *S. aureus* aos antibióticos eritromicina e ciprofloxacina, e da bactéria *E. coli* aos antibióticos tetraciclina, ciprofloxacina e penicilina G, são resultados consistentes com o perfil de resistência fornecido pelo sistema automatizado VITEK. Um sistema automatizado VITEK, consiste num equipamento que está equipado com um programa para a validação dos testes de resistência aos antibióticos e a interpretação dos resultados.

Sabe-se que a vancomicina inibe a síntese da parede celular das bactérias Gram positivo, sendo inactiva contra bactérias Gram negativo [22], estando tais factos de acordo com os resultados obtidos.

De um modo geral, é possível constatar que os sesquiterpenóides potenciam a actividade antimicrobiana dos antibióticos, nomeadamente, da TE 10, AMC 30, do IMP 10 e da VA 30 quando aplicado contra *S. aureus*, e os antibióticos AMC 30 e CAZ 30 quando testado contra *E. coli*.

Os factores que poderão estar relacionados com o aumento do efeito dos antibióticos potenciado pelos sesquiterpenóides são, por um lado, devido à lipofilicidade inerente dos compostos terpénicos, que mostram uma afinidade com as membranas biológicas, onde a sua acumulação pode ter um impacto substancial sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas [55]. Por outro lado, devido ao efeito sinérgico entre os sesquiterpenóides e os antibióticos.

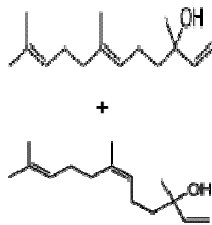
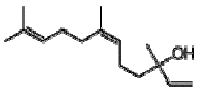
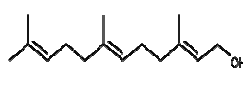
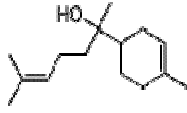
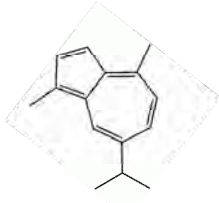
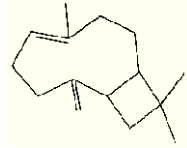
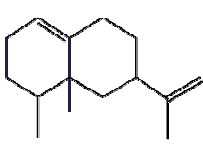
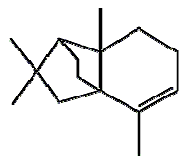
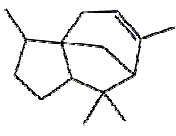
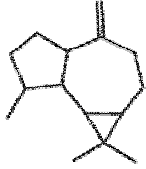
Num estudo anterior, foi proposto que moléculas com cadeias de hidrocarbonetos desempenham um papel funcional importante na promoção da interacção com o interior da bicamada lipídica [55]. Assim, seria de esperar que com os compostos *trans*-farnesol, *cis*-nerolidol, nerolidol e α -bisabolol fosse visível um aumento mais prenunciado do aumento do efeito antimicrobiano, pois estes compostos possuem uma cadeia de hidrocarbonetos (Tabela 13), fornecendo-lhes maior flexibilidade e polaridade, o que facilita a interacção com a bicamada lipídica das bactérias, favorecendo a entrada dos antibióticos na célula bacteriana. No entanto, não é isso que se verifica.

O valenceno, o guaiazuleno, o *trans*-cariofileno, o (-)- α -neoclaveno e o α -cedreno, por sua vez, apresentam uma estrutura mais rígida e mais hidrofóbica, possuindo menor flexibilidade, sendo de esperar um menor efeito antimicrobiano dos antibióticos na presença destes sesquiterpenóides. Contudo, verifica-se contrário, pois na presença destes compostos observa-se um maior efeito no aumento da susceptibilidade da *S. aureus* aos antibióticos.

Daqui, destaca-se o valenceno por potenciar um maior aumento da susceptibilidade da *S. aureus* aos antibióticos TE 10, IMP 10, VA 30 e AMC 30. Para estes antibióticos observa-se um aumento do diâmetro do halo de inibição para as três massas estudadas, sendo este aumento é proporcional à massa de sesquiterpenóide adicionado. É importante ter em consideração o facto de o valenceno possuir um grau de pureza de 70%, e o efeito potenciado por este sesquiterpenóide pode também estar relacionado com um outro composto que esteja presente na mistura.

3. Resultados e Discussão

Tabela 13. Similaridade estrutural dos compostos sesquiterpênicos e respectivas características estruturais.

Similaridade estrutural dos sesquiterpenóides			
Nerolidol	cis – Nerolidol	trans-Farnesol	Estruturas lineares com um grupo hidroxilo que confere à molécula flexibilidade e polaridade da parte da cadeia linear.
			
α-Bisabolol	Estrutura constituída por uma anel de 6 carbonos com uma ligação dupla que lhe confere alguma hidrofobicidade e por uma cadeia linear de 8 carbonos com um grupo hidroxilo que confere flexibilidade e polaridade à molécula.		
			
Guaiazuleno	Estrutura constituída por dois anéis insaturados, conferindo rigidez e hidrofobicidade à molécula.		
			
trans – Cariofileno	Valenceno	Estruturas com dois anéis e duas ligações duplas, que confere a este compostos alguma rigidez e hidrofobicidade.	
			
(-)-α-Neoclaveno	α-Cedreno	(+) - Aromadendreno	Estruturas constituídas por três anéis e uma ligação dupla que confere a este compostos alguma rigidez e hidrofobicidade à estrutura.
			

O antibiótico IMP 10 na presença do *cis*-nerolidol, valenceno, guaiazuleno, *trans*-cariofileno e (+)-aromadendreno foi o antibiótico que apresentou maior actividade, medido por um aumento dos halos de inibição, bem como a P 10 na presença de guaiazuleno e *trans*-cariofileno. No entanto, o efeito é visível apenas para a massa superior do respectivo sesquiterpenóide.

Os antibióticos AMC 30, CAZ 30 e IMP 10 na presença dos sesquiterpenóides *trans*-cariofileno, (+)-aromadendreno e α -cedreno, bem como o CAZ 30 na presença do guaiazuleno, manifestam um efeito antagônico contra a *E.coli*.

Tendo em conta que a AMC 30, a CAZ 30 e o IMP são antibióticos β -lactâmicos, o que poderá estar acontecer é que de alguma forma os sesquiterpenóides podem estar a potenciar a produção de β -lactamases com acção hidrolítica, as quais vão inactivar o antibiótico. A Figura 18 apresenta a estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos, originando compostos sem eficácia antibacteriana. As β -lactamases das bactérias de Gram negativo localizam-se no espaço periplásmico e inactivam o antibiótico β -lactâmico logo que este atravessa a membrana externa [65].

Por outro lado, este fenómeno poderá também estar relacionado com o efluxo dos antibióticos na célula bacteriana, pelo efeito exacerbado de algumas enzimas como as transpeptidases, carboxipeptidase e transglicosidases que participam na formação, manutenção da matriz e regulação da matriz do peptidoglicano, ou ainda, pela inibição competitiva entre o antibiótico e o sesquiterpenóide, devido à semelhança estrutural entre o anel β -lactâmico dos antibióticos e os compostos sesquiterpénicos.

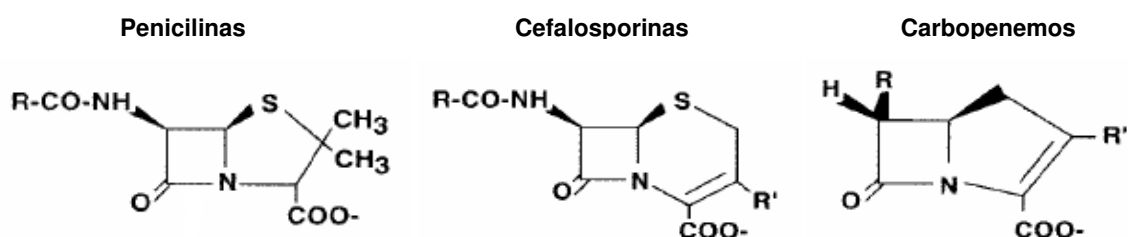


Figura 18. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos [65].

De acordo com os resultados, pode afirmar-se que a *E. coli* apresenta maior resistência aos antibióticos. Em bactérias Gram negativo, uma membrana externa e um conjunto de bombas de multirresistência são barreiras bastante eficazes para os compostos antimicrobianos. As bactérias Gram positivo possuem uma parede celular permeável que normalmente não restringe a penetração de agentes antimicrobianos [22]. As tabelas 14 e 15 apresentam o resumo dos resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade das bactérias *S. aureus* e *E.coli*.

É importante referir que estes ensaios são preliminares, sendo necessário realizar outros testes como o efeito pós-antibiótico, “time-kill curves” e avaliação da integridade da membrana.

Será ainda importante repetir os ensaios em diferentes condições de forma a se poder confirmar a relação entre a adição dos sesquiterpenóides e a actividade antimicrobiana, nomeadamente aqueles que apresentaram um aumento estatisticamente significativo do diâmetro do halo de inibição quando em presença do sesquiterpenóide quando comparado com o ensaio controlo.

Ao repetir o ensaio seria importante fazer algumas alterações a nível de procedimento, tais como: i) mergulhar o disco de antibiótico directamente no sesquiterpenóide, para que a difusão do antibiótico e do sesquiterpenóide ocorra em simultâneo e ii) aumentar a massa de sesquiterpenóide de forma a verificar se o efeito observado nas concentrações testadas se mantém.

3. Resultados e Discussão

Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade de *S. aureus* aos antibióticos.

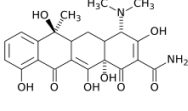
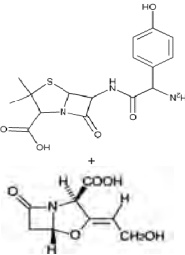
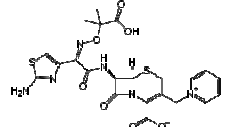
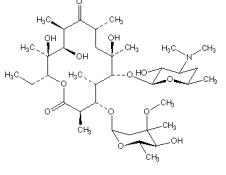
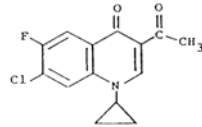
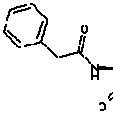
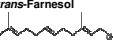
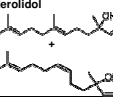
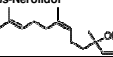
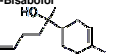
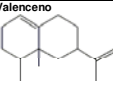
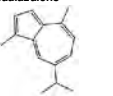
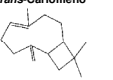
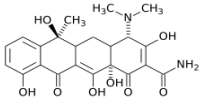
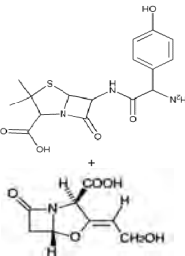
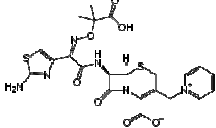
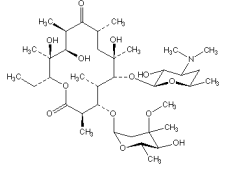
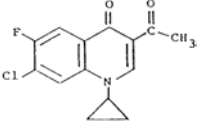
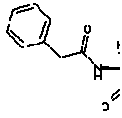
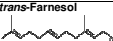
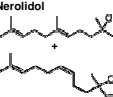
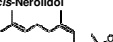
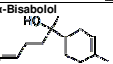
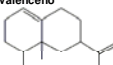
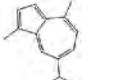
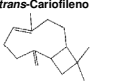
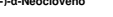
	Antibióticos					
	Tetraciclina	Amoxicilina/Ác. clavulâmico	Ceftadizima	Eritromicina	Ciprofloxacina	Penicili
Compostos						
 <i>trans</i> -Farnesol	Aumento da susceptibilidade	Ausência de susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Resiste
 Nerolidol	Aumento da susceptibilidade	Ausência de susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Resiste
 <i>cis</i> -Nerolidol	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Resiste
 α -Bisabolol	Ausência de susceptibilidade	Ausência de susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Resiste
 Valenceno	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Resiste
 Guaiazuleno	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Aument susceptib
 <i>trans</i> -Cariofileno	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resistente	Aument susceptib

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na susceptibilidade de *E. coli* aos antibióticos

	Antibióticos					
	Tetraciclina	Amoxicilina/Ác. cluavulâmico	Ceftazidima	Eritromicina	Ciprofloxacina	Penicilli
Compostos						
 <i>trans</i> -Farnesol	Resistente	Ausência de susceptibilidade	Ausência de susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resiste
 Nerolidol	Resistente	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resiste
 <i>cis</i> -Nerolidol	Resistente	Ausência de susceptibilidade	Ausência de susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resiste
 α -Bisabolol	Resistente	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resiste
 Valenceno	Resistente	Aumento da susceptibilidade	Aumento da susceptibilidade	Resistente	Resistente	Resiste
 Gualazuleno	Resistente	Ausência de susceptibilidade	Efeito antagonico	Resistente	Resistente	Resiste
 <i>trans</i> -Cariofileno	Resistente	Efeito antagonico	Efeito antagonico	Resistente	Resistente	Resiste
 (-)- α -Neocloveno						

4. **CONCLUSÃO**

Com base na metodologia de HS-SPME/GC-MS foi estudada a composição do bagaço de uva e do respectivo destilado, obtido por destilação por arrastamento de vapor. Com vista a incrementar a eficiência extractiva foi realizada uma etapa de selecção da fase estacionária de SPME. Na optimização da fase estacionária de SPME, as duas fases estacionárias estudadas foram a PDMS e DVB/CAR/PDMS, verificando-se que esta última apresentou maior eficiência extractiva, visível por um maior número de compostos extraídos e maiores áreas.

Em termos de reprodutibilidade, a fase estacionária de PDMS mostrou-se mais reprodutível para o grupo dos aldeídos, ésteres e álcoois e a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS é mais reprodutível para o grupo dos hidrocarbonetos, ácidos e os sesquiterpenos. De acordo com os resultados obtidos, a fase estacionária seleccionada foi a de DVB/CAR/PDMS.

Na caracterização da fracção volátil do bagaço de uva e do respectivo destilado por HS-SPME/GC-MS com a fase estacionária de DVB/CAR/PDMS, verificou-se que no bagaço de uva se consegue extrair um maior número de compostos (93 compostos) comparativamente com o destilado (80 compostos). O grupo de compostos que mais contribuiu para a área cromatográfica total quer do bagaço quer do destilado foram os ésteres seguidos dos álcoois para as duas amostras. Do número total de compostos identificados, 22 e 19 deles correspondem a sesquiterpenóides no bagaço de uva e no destilado, respectivamente. No entanto, os sesquiterpenóides maioritários encontrados no bagaço foram o α -ilangeno e β -bourbureno, já no destilado foram o nerolidol e o *trans*-farnesol. Num trabalho futuro, seria importante quantificar a fracção volátil do destilado, já que este possui um número considerável de sesquiterpenóides.

Após a caracterização da composição volátil do bagaço e do destilado, foi possível seleccionar os compostos sesquiterpénicos para avaliação a toxicidade e mutagenicidade usando o teste de Ames. Os padrões puros seleccionados foram: o nerolidol, o guaiazuleno e o *trans*-cariofileno que foram identificados no bagaço e no destilado; o valenceno e o (+)-aromadendreno identificados no bagaço; o *trans*-farnesol presente no destilado; o α -cedreno que embora não tenha sido identificado nas amostras em estudo, já foi identificado em amostras de vinho da variedade Baga. O *cis*-nerolidol, o α -bisabolol e o (-)- α -neoclaveno, foram seleccionados tendo em conta a estrutura química e os grupos substituintes. Estes compostos ainda não foram identificados nas amostras da variedade de *Vitis vinifera* L.

Deste estudo, constata-se que para a estirpe TA98 de *Salmonella typhimurium*, na gama de massas entre as 13-204 $\mu\text{g/placa}$ para os compostos (-)- α -neoclaveno, valenceno, (+)-aromadendreno, *trans*-cariofileno e α -cedreno, entre as 14-222 $\mu\text{g/placa}$ para o *trans*-farnesol, nerolidol, *cis*-nerolidol e α -bisabolol, e entre as 12-198 $\mu\text{g/placa}$ de guaiazuleno não apresentam efeito tóxico, na ausência e presença de activação metabólica.

Para a estirpe TA100 de *Salmonella typhimurium*, três dos compostos mostraram toxicidade, o *trans*-farnesol, nerolidol e α -bisabolol para a massa entre as 14 e 222 $\mu\text{g/placa}$, sem activação metabólica. Para massas inferiores a 14 $\mu\text{g/placa}$, estes compostos já não manifestam o efeito tóxico. Os restantes compostos não apresentam toxicidade, quer sem ou com activação

metabólica, nos mesmos intervalos de massas referidos para a estirpe TA 98 de *Salmonella typhimurium*.

Conclui-se ainda que na gama de massas estudadas, os compostos sesquiterpénicos não induzem mutagenicidade, quer com ou sem activação metabólica para ambas as estirpes de *Salmonella typhimurium*.

Com a gama de massas não tóxicas definida, procedeu-se à avaliação do efeito da adição de sesquiterpenóides na actividade antimicrobiana de antibióticos. Para tal, foi usado o método de difusão em placa de agar, permitindo avaliar o efeito sinérgico dos sesquiterpenóides com os antibióticos.

Deste estudo, averiguou-se que a presença dos sesquiterpenóides potenciam o efeito dos antibióticos tetraciclina, amoxicilina/ ác. clavulânico, imipenemo e vancomicina aumentando a sensibilidade da bactéria *Staphylococcus aureus*. Dos sesquiterpenóides usados é de destacar o valenceno, identificado na amostra de bagaço, que apresentou sinergismo com os antibióticos referidos anteriormente, sendo o aumento do halo de inibição proporcional à massa de composto. Também o *trans*-cariofileno e o guaizuleno presentes no bagaço e no destilado e o *cis*-nerolidol têm um efeito sinérgico com os antibióticos tetraciclina, amoxicilina/ ác. clavulânico, imipenemo, penicilina e a vancomicina. O *trans*-farnesol presente apenas no destilado aumenta a susceptibilidade da *Staphylococcus aureus* apenas ao antibiótico tetraciclina.

Por sua vez, a *Escherichia. coli* apresenta maior susceptibilidade aos antibióticos amoxicilina/ ác. clavulânico e ceftadizima na presença do nerolidol, α -bisabolol e valenceno, manifestando um efeito sinérgico apenas para as massas superiores.

Os restantes compostos apresentam um efeito antagónico. Dada a semelhança estrutural, esta redução da actividade antimicrobiana resultará possivelmente da competição entre os sesquiterpenóides e os antibióticos. Este efeito manifesta-se para o guaiazuleno, *trans*-cariofileno, (+)-aromadendreno e o α -cedreno. A *Escherichia. coli* apresenta, assim, maior resistência aos antibióticos comparativamente com *Staphylococcus aureus*.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Kotamballi, N.; Murthy, C.; Singh, R.P.; Jayaprakasha, G.K. 2002. Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5909-5914.
- [2] Nestle: <http://www.nestle.pt/bemestar/presentation/nutricao/Alimentos.aspx?id=142>. Disponível no dia 12-08-2009.
- [3] FAOSTAT (2009). FAO Statistical Database, <<http://www.fao.org>>.
- [4] Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D.R.; Carle R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112:551–559.
- [5] Torres, J.L.; Varela, B.; Garcia, M.T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelle, J.J.; Cascante, M.; Sort, X.; Bobet, R. 2002. Valorization of Grape (*Vitis vinifera*) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:7548-7555.
- [6] Campos, L.M.A.S.; Leimann, F.V.; Pedrosa, R.C.; Ferreira, S.R.S. 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99:8413–8420.
- [7] Meyer, A.S.; Jepsen, S.M.; Sørensen, N.S. 1998. Enzymatic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace. *Journal Chromatography Food Chemistry*. 46:2439-2446.
- [8] Baumgärtel, T.; Kluth, H.; Epperlein, K.; Rodehutschord, M. 2007. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research*, 67:302–306.
- [9] Llobera, A.; Canellas, J. 2007. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* 101:659–666.
- [10] Withers, S.T.; Keasling, J.D. 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73:980–990.
- [11] Dewick, P.M. 2002. *Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach – Second Edition*. John Wiley & Sons Ltd. Chapter 5.
- [12] Prosser, I.; Phillips, A.L.; Gittings, S.; Lewis, M.J.; Hooper, A.M.; Pickett, J.A. Beale, J.H. 2002. (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. *Phytochemistry*, 60:691–702.
- [13] Rocha S. M.; Coelho E.; Vinholes J.; Coimbra M.A. 2006. “Grapes and wine from *Vitis vinifera* L. as a potential source of sesquiterpenoids”, *Natural Products, Series Recent Progress in Medicinal Plants*, Editora Studium Press LLC, Huston, Texas, USA, Vol.15, Chapter XII.

- [14] Wenguang, J.; Wenlai, F.; Yan, X.; Guang'ao, Z.; Jiming, L.; Ying, Y. 2007. Analysis of Free Terpenoids in *Vitis vinifera* Using Solvent Assisted Flavour Evaporation and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 25:881–886.
- [15] Coelho, E.; Rocha, S.M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. 2006. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening. *Analytica Chimica Acta*, 563:204–214.
- [16] Luckner, J.; Bowen, P.; Bohlmann, J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*, 65:2649–2659.
- [17] Ruberto, G.; Renda, A.; Amico, V.; Tringali, C. 2008. Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology*, 99:260–268.
- [18] Alves, R.F.; Nascimento, A.M.D.; Nogueira, J.M.F. 2005. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Analytica Chimica Acta*, 546:11–21.
- [19] Allouche, N.; Apel, C.; Martin, M.T.; Dumonte, V.; Guéritte, F.; Litaudon, M. 2009. Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, 70:546–553.
- [20] Prosser, I.; Phillips, A.L.; Gittings, S.; Lewis, M.J.; Hooper, A.M.; Pickett, J.A.; Beale, M.H. 2002. (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. *Phytochemistry*, 60:691–702.
- [21] Meccia, G.; Rojas, L.B.; Velasco J.; Díaz, T.; Usubillaga, A. 2007. Composition and Antibacterial Screening of the Essential Oils of Leaves and Roots of *Espeletia angustifolia* Cuatrec. *Natural Product Communications*, 2:1199-1336.
- [22] Simões, M.; Cleto, S.; Pereira, M.O.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A.; Vieira, M.J. 2008. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility using sesquiterpenoids. *Medicinal Chemistry* 4:616-623.
- [23] Dórea, H.S.; Gaujac, A.; Navickiene, S. 2008. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. *Scientia Plena*, 4:1-7.
- [24] Lord, H.L.; Pawliszyn, J. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology-Review. *Journal of Chromatography A*, 885:153-193.
- [25] Deng, C.; Xu, X.; Yao, N.; Li, N.; Zhang, X. 2006. Rapid determination of essential oil compounds in *Artemisia Selengensis* Turcz by gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 556:289–294.

- [26] Garcia-Esteban, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Ruiz, J. 2004. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*, 64:458-466.
- [27] Martins, V.M.R. 2001. Desenvolvimento da técnica de microextração em fase sólida (SPME) na identificação e quantificação de compostos voláteis de vinhos brancos da Bairrada. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química.
- [28] Petronilho, S.L. 2008. Caracterização da fracção sesquiterpénica de populações de camomila (*Matricaria recutita* L.). Tese de mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química.
- [29] Valente, A.L.P. Augusto, F. 1999. Microextração por fase sólida. Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - CP 6154 - 13083-970 - Campinas – SP.
- [30] Dias, E.M.C. 2008. Desenvolvimento de uma metodologia por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME/GC-MS) para detecção de *Helicobacter pylori* através da utilização de amidas alifáticas. Tese de mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química.
- [31] Augusto, F.A. Valente, L.P. 2002. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 21:428-438.
- [32] Bortoluzzi, J.H. 2003. Confeção de fibras de Micro-extração em Fase Sólida (SPME) e aplicação de produtos na degradação térmica do poli(propileno). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.
- [33] Mester, Z. Sturgeon, R.; Pawliszyn, J.; 2001. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation – Review. *Spectrochimica Acta Part B*, 56:233-260.
- [34] Supelco, 1998. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions, T198923, Sigma-Aldrich Co.
- [35] Alpendurada, M.F. 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis - Review. *Journal of Chromatography A*, 889:3–14.
- [36] Tankeviciute, A. Adomaviciute, E.; Kazlauskas, R.; Vickaite, V.; 2004. Solid phase microextraction of esters: comparison of headspace and direct extraction. *Chemija*, 15:21-26.
- [37] Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J. 1999. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *The Analyst*, 124:643-649.
- [38] Karasek, F.W.; Clement, R.E. 1988. Basic gás Chromatography – Mass Spectrometry: principles and techniques. Elsevier, Capítulo. 4.
- [39] Harris, D.C. 2005. Análise Química Quantitativa, LTC – Livros Técnicos e científicos. Sexta Edição, Capítulos 22 e 24.

- [40] Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; McEwen, C.N. 1996. Gas chromatography and Mass spectrometry: a practical guide. Academic Press, Capítulos 1 e 3.
- [41] Hodgson, E.; Smart, R.C. 2001. Introduction to Biochemical Toxicology – Third Edition. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. Chapter nine.
- [42] Hakura, A.; Suzuki, S.; Satoh, T. 1999. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. Mutation Research, 438:29–36.
- [43] Hakura, A.; Suzuki, S.; Sawada, S.; Motooka, S.; Satoh, T. 2002. An improvement of the Ames test using a modified human liver S9 preparation. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 46:169–172.
- [44] Maron, D.M.; Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113:173-215.
- [45] Pereira, R.; Marques, C.R.; Ferreira, M.J. S.; Neves, M.F.J.V.; Caetano, A.L. ; Antunes, S.C.; Mendo, Gonçalves, S. F. 2009. Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area. Applied Soil Ecology, 42:209–220.
- [46] Neves, M.F.J.V. 2007. Avaliação do Potencial Genotóxico de uma mina de urânio abandonada. Tese de mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia.
- [47] Noushad, M.; Kannan, T.P.; Husein, A.; Abdullah, H.; Ismail, A. R. 2009. Genotoxicity evaluation of locally produced dental porcelain – An in vitro study using the Ames and Comet assays. Toxicology in Vitro, 23:1145–1150.
- [48] USFDA – United States Food and Drug Administration, 2000. Bacterial Reverse Mutation Test. Office of the Food Additive Safety. Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Acesso em: <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1a.html>, em Setembro de 2009.
- [49] Franzman, M.R.; Burnell, K.K.; Dehkordi-Vakil, F.H.; Guthmiller, J.M.; Dawson, D.V.; Brogden, K.A. 2009. Targeted antimicrobial activity of a specific IgG–SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. International Journal of Antimicrobial Agent, 33:14–20.
- [50] Scavizzi, R.M.; Labia, R.; Petitjean, O.J.; Elbhar, A. 2002. Antimicrobial susceptibility test: from bacterial population analysis to therapy-Original article. International Journal of Antimicrobial Agents, 19:9–20.
- [51] <http://www.e-escola.pt>, disponível em Setembro 2009.

- [52] Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 1997. Book Biology of Microorganisms - Eighth Edition. Prentice Hall, International Edition. Chapter 21.
- [53] Seeley, J.H.W.; VanDermark, P.J. 1981. Selected Exercises from Microbes in Action – A Laboratory Manual of Microbiology. Third Edition. W. H. Freeman and Company. Seção XV.
- [54] Scavizzi, M.R.; Labia, R.; Petitjean, O.J.; Elbhar, A. 2002. Antimicrobial susceptibility test: from bacterial population analysis to therapy - Original article. International Journal of Antimicrobial Agents, 19:9–20.
- [55] Brehm-Stecher, B.F.; Johnson, E.A. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apitone. Antimicrob. Agents, 10:3357–3360.
- [56] Mouchet, F.; Gauthier, L.; Mailhes, C.; Jourdain, M.J.; Ferrier, V.; Triffault, G.; Devaux, A. 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (MutatoxR and Ames tests). Science of the Total Environment, 355:232– 246.
- [57] Mortelmans, K.; Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455:29-60.
- [58] Coutry, B.; Curieux, F.L.; Milon, V.; Marzin, D. 2004. Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. Mutation Research, 565:23-34.
- [59] Monarca, S.; Feretti, D.; Zerbini, Ilaria.; Alberti, A.; Zani, C.; Resola, S.; Gelatti, U.; Nardi, G. 2002. Soil Contamination Detected Using Bacterial and Plant Mutagenicity Tests and Chemical Analyses. Environmental Research Section A, 88:64-69.
- [60] Ferreira, P.R.S.J.C. 2007. Volatile composition of *Vitis vinifera* L. Fernão-Pires variety from Bairrada Appellation: 1. Comparison with other major white grape varieties; 2. Development of methodologies of analysis. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química.
- [61] Oliveira, J.M.; Maia, J.S.; Maia, M.O. 1995. Influência do processo de clarificação do mosto sobre o desenvolvimento do aroma fermentario do grupo dos ésteres em vinhos verdes brancos. IX Encontro Galécio-português de Química, Química Agraria y Alimentaria, Faculdade de Ciências, Lugo, 22, 23 y 24 de Novembro.
- [62] Uenojo, M.; Junior, M.R.M.; Pastore, G.M. 2007. Carotenóides: Propriedades, Aplicações e biotransformação de compostos de aroma. Química. Nova, 30:616-622.

- [63] Gomes-Carneiro, M.R; Viana, M.E.S.; Felzenszwalb, I.; Paumgartten, F.J.R. 2005. Evaluation of b-myrcene, a-terpinene and (+) - and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. Food and Chemical Toxicology, 43:247–252.
- [64] Gomes-Carneiro, M.R; Dias, D.M.M.; De-Oliveira, A.C.A.X.; Paumgartten, F.J.R. 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. Mutation Research, 585:105–112.
- [65] Reis T.M. 2008. Metallo- β -Lactamases VIM-2 em Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

Anexos

Anexo 1

Destilação por arrastamento de vapor

Protocolo

Uma destilação consiste fundamentalmente na volatilização de um líquido e na condensação dos vapores produzidos. A destilação por arrastamento de vapor é particularmente útil no isolamento e purificação de compostos com elevado ponto de ebulição e/ou que se decomponham a temperaturas muito elevadas devendo estes, no entanto, ser imiscíveis em água. Quando estamos perante uma mistura heterogénea (critério de imiscibilidade verificado), pode recorrer-se a uma destilação por arrastamento de vapor para proceder à purificação e isolamento dos seus componentes.

Materiais

- Balão volumétrico de duas tobuladuras (1 L);
- Manta de aquecimento;
- Cabeça de destilação;
- Condensador;
- Adaptador;
- Termómetro;
- Copo
- Três garras com suporte.
- Balão volumétrico (500 mL)
- Tina

Procedimento

- 1º. Pesam-se 50.0 g de bagaço (massa correspondente a 1/3 do volume do balão volumétrico);
- 2º. Transfere-se o bagaço para o balão;
- 3º. Adicionar 500.0 mL de água destilada (correspondente a metade do volume do balão);
- 4º. Fazer a montagem para proceder à destilação;
- 5º. Verificar o fluxo de água do condensador, que não deve estar no máximo;
- 6º. Ligar a manta de aquecimento;
- 7º. Durante a destilação deve ser adicionada água do funil de carga, gota a gota, de forma a manter constante o volume de solução no balão de destilação;
- 8º. Interromper a destilação quando conveniente;

No final da destilação tem de se desligar a manta de aquecimento, fechar a torneira da água que entra no condensador e deixar a solução que se encontra no balão de destilação arrefecer. Depois desmonta-se a montagem e lava-se o material.

Neste caso, como não se obteve uma separação da fase orgânica e aquosa recolheu-se o destilado, tendo sido conservado não frio.

Anexo 2

Avaliação do potencial tóxico e mutagénico dos sesquiterpenóides

Protocolo [46]

1. Princípio

O teste de Ames ou teste da *Salmonella typhimurium* foi desenvolvido para detectar mutagénicos químicos. Este teste foi previamente efectuado com a estirpe *S. typhimurium* que requer histidina, também pode ser realizado usando a estirpe de *Escherichia coli* que também requer triptofano, aumentando a habilidade do teste para detectar químicos com diferentes mecanismos de acção. O teste das estirpes de ambas as espécies sofrera mutações que as tornam incapazes de produzir aminoácidos essenciais (histidina e triptofano, respectivamente) para o crescimento e formação de colónias. O princípio deste teste é que diferentes cepas de bactérias são expostas aos sesquiterpenóides cujo potencial mutagénico é avaliado através da sua capacidade de induzir mutações que revertem mutações anteriores de cepas das bactérias. Consequentemente, estas estirpes tornam-se capazes de sintetizar aminoácidos essenciais para o seu crescimento, dando origem às colónias num meio onde estes aminoácidos essenciais se encontram ausentes.

2. Estirpes de bactérias usadas

Estirpe de bactéria	Mecanismo de mutação genética
<u><i>Salmonella typhimurium</i></u>	
TA 98	hisD3052 (-1 frameshift mutation perto de uma sequência repetitiva -C-G-CG- C-G-C-G
TA 100	Substituição par-base (substituição da leucina GAG/CTC pela prolina GGG/CCC)

3. Controlos positivos

Lista de compostos químicos usados para os controlos positivos para cada estirpe de bactéria sem activação metabólica (sem S9).

Bactéria		Controlo positivo	
Espécie	Estirpe	Sem S9	Com S9
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98	2-nitrofluoreno	2-aminoantraceno
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 100	nitrofurantoína	2-aminoantraceno

Para os ensaios com activação metabólica, os compostos usados para o controlo positivo são normalmente:

- Benzo(a)pireno
- 2-aminoantraceno

4. Preparação dos reagentes

4.1. Soluções para preparar as placas de agar de crescimento

a. Vogel-Bonner (sais VB)

b. Adicionar os ingredientes acima na ordem indicada a 650ml de água quente num balão 2L. Certificar-se que cada sal é dissolvido cuidadosamente por agitação com um agitador magnético, antes de adicionar o próximo sal.

Reagentes	Massa
Mg2SO4.7H2O	1 g
Ácido cítrico. H2O	10 g
K2HPO4.anidro	50 g
NaNH4HPO4.4H2O	17,5 g

c. Ajustar o volume a 100 mL.

d. Distribuir em alíquotas de 20 mL e autoclavar, com as tampas mal apertadas durante 30 min a 121°C.

e. Após as soluções terem arrefecido, apertar as tampas e armazenar à temperatura ambiente no escuro.

A. Solução de glucose (10% v/v)

Esta solução irá servir como fonte de carbono para as placas agar.

Reagentes	Massa
Dextrose	25 g

a. Adicionar a dextrose a 150 mL em água destilada num balão de 500 mL.

- b. Agitar com agitador magnético até que a mistura esteja clara.
- c. Aferir o volume final de 250 ml com água destilada.
- d. Distribuir os 250 mL em alíquotas de 50 mL. Etiquetar a glucose 10% com os dados.
- e. Autoclavar a 121°C por 20 min.
- f. Deixar arrefecer e armazenar a 4°C.

B. Placas de agar de crescimento

Este teste serve como base para o teste de mutagenicidade.

Reagentes	Massa/volume
Agar	15 g
Solução de sal VB (50X)	20 mL
Solução de glucose (10% v/v)	50 mL

- a. Adicionar o agar a 900 mL em água destilada num balão de 1 L. Autoclavar a mistura por 30 min a 121°C.
- b. Deixar a mistura arrefecer por 45 min até aos 65 °C. Adicionar os sais estéreis e homogeneizar a mistura.
- c. Adicionar a solução de glucose (10% v/v) estéril.
- d. Dispersar o médio agar em placas de petri de 100x15 mm, aproximadamente 25 ml/placa.
- e. Depois de estar solidificado, armazenar as placas a 4°C. As placas podem ser armazenadas durante várias semanas em sacos de plástico selado.

Nota: Preferencialmente, as placas deveriam ser preparadas em 1-2 dias antes do ensaio e armazenado à temperatura ambiente em sacos de plástico selados para a condensação prévia da humidade. O agar nunca devese ser autoclavado com o sais VB e glucose já misturados.

7.2. Soluções de agar de topo

A. Solução histidina/biotina

Esta solução vai ser usada como suplemento do top agar com excesso de biotina e quantidade mínima de histidina.

Reagentes	Massa
D-biotina (F.W. 247)	12,4 mg
L-histidina.HCl (F.W. 191.7)	9,6 mg

- a. Pesar a biotina e colocá-la num erlenmeyer e adicionar 60 ml de água destilada e colocar a aquecer numa placa de aquecimento, quando já estiver totalmente dissolvida adicionar a histidina. A biotina demora um pouco a dissolver, mas a histidina dissolve rapidamente.
- b. Aferir a 100 mL.
- c. Autoclavar a solução por 20 min a 121°C.
- d. Armazenar a 4°C em frascos de vidro.

B. Agar de topo suplementado com histidina/biotina

Esta agar será usado para distribuir a bactéria, o química ao a substancia teste e o tampão fosfato (ensaio sem S9) ou S-9mix (ensaio com S9)

Reagentes	Massa/volume
Agar	3 g
Cloreto de sódio	3 g
Solução histidina/biotina (0,5 mM)	50 mL

- a. Adicionar o agar e o cloreto de sódio a 300 mL de água destilada num balão de 0,5 L. Aquecer e agitar numa placa para dissolver o agar.
- b. Adicionar 50 mL de solução de histidina/biotina (0,5 mM) e fazer o volume de 500 mL com água destilada.
- c. Distribuir alíquotas de 250ml em frascos de 500ml com tampa de rosca.
- d. Etiquetar o top agar com a data de preparação.
- e. Autoclavar por 30°C e armazenar a temperatura ambiente no escuro.
- f. Quando necessário derreter o top agar no forno de microondas ou em água em ebulição.

7.3. Meio para preparar culturas das estirpes para os ensaios

A. Nutriente Broth

Este meio é usado no crescimento da bactéria durante a noite.

Reagente	Massa
Oxido nutriente broth #2	2,5 g

- a. Adicionar o nutriente broth 100 mL de água destilada e agitar até dissolver.
- b. Distribuir 50 mL em cada frasco..
- c. Autoclavar por 20 min a 121°C.
- d. Quando arrefecido armazenar à temperatura ambiente no escuro.

7.4. Tampão fosfato de sódio (0,2M, pH=7.4)

Este tampão é usado para testes químicos na observação da actividade metabólica.

Reagentes	Volume
Fosfato dihidrogenio de sódio (0.2M) 500 mL de água destilada e 13,8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60 mL
Fosfato hidrogenio de di-sódio (0.2M) 500 mL de água destilada e 14,2 g de Na_2HPO_4	440 mL

- Preparar cada solução individualmente de acordo com a tabela.
- Misturar 60 mL de fosfato di-hidrogénio de sódio com 440 mL fosfato hidrogénio de di-sódio.
- Ler o pH a adicionar mais fosfato hidrogénio de di-sódio se necessário para ajustar o pH a 7,4.
- Autoclavar por 20 min a 121°C.

7.5. Soluções para a mistura de S9

A. Solução NADP (0.1M)

Reagentes	Massa
NADP	191,5 mg

- Num tubo esterilizado pesar 191,5 mg de NADP.
- Adicionar 2,5 mL de água destilada e homogeneizar no vortex.
- Normalmente não é necessário esterilizar a solução, mas esta pode ser feita uma filtração através de um filtro de 0,2 μm .

B. Solução MgCl_2 – KCl (1.65M KCl e 0.4M MgCl_2)

Reagentes	Massa
KCl	6.15 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.07 g

- Pesar cada sal e adicionar 50 mL de água destilada. Deixar dissolver com agitador magnético.
- Autoclavar por 20 min a 121°C.
- Armazenar a solução a 4°C.

C. Solução de glucose-6-fosfato (1M)

Reagentes	Massa
Glucose-6-fosfato	2.82 g

- Pesar a glucose-6-fosfato a adicionar 10 mL de água destilada.
- Esterilizar a solução filtrada através de um filtro de 0.2 µm.
- Pode ser armazenada a 4°C por 6 meses.

D. Mistura S9

A composição por 50 mL de mistura padrão (S9 – 4%) é (Maron and Ames, 1983):

Reagentes	Volume
Água destilada esterilizada	16.75 mL
0.2M tampão fosfato (pH=7.4)	25 mL
0.1M NADP	0.25 mL
Sais de MgCl ₂ - KCl	1 mL
S9 fígado de rato (Aroclor-1254 induced)	2 mL

- Os reagentes deverão ser adicionados precisamente pela ordem que aparecem na tabela. A solução deve ser preparada no início de cada ensaio e mantida em muito gelo.

7.6. Soluções para preparar placas enriquecidas com agar GM

Estas placas são utilizadas para fornecer um meio suplementado com nutrientes essenciais e antibióticos para controlar a tensão, a propagação de estirpes e de preparação do stock da cultura master plates.

A. Solução de biotina (0.01% w/v)

Esta solução irá servir para enriquecer as placas de agar GM para verificar a estirpe, re-isolação da estirpe e placa mestra de cultura de conservada em stock. A composição de 100 ml da solução é:

Reagentes	Massa/volume
Água destilada	100 mL
D-biotina	10 mg

- a. Aquecer a água a ebulição e adicionar a biotina. Agitar até dissolver completamente.
- b. Esterilizar a solução com filtros de 0.45 µm.
- c. Armazenar a 4°C.

B. Solução de histidina (0.5% w/v)

Esta solução irá servir para enriquecer as placas de ágar GM para verificar a estirpe, re-isolação da estirpe e placa mestra de cultura de conservada em stock. A composição de 100 ml da solução é:

Reagentes	Massa/volume
Água destilada	100 mL
L-histidina	500 mg

- a. Dissolver a histidina em água.
- b. Autoclavar por 15 min a 121°C.
- c. Armazenar a 4°C.

14. Preparação do controlo positivo

A concentração de mutagênicos escolhido para o ensaio nunca deverá exceder os 10 µg/placa. Por isso, esta concentração deve ser dissolvida em 0.05 mL de água destilada. Esta solução deve ser adicionada em substituição do sesquiterpenóide ou água destilada (controlo negativo) nas placas de controlo positivo.

15. Contagens de colónias revertentes e relatório de dados

Depois de as placas serem retiradas do incubador, contar as colónias e expressar os resultados em colónias revertentes por placa. Todas as placas de uma experiência, incluindo controlos positivos e negativos devem ser contadas usando o mesmo método e ao mesmo tempo porque as células na placa continuarão a dividir e produzir mais colónias do mutante com o aumento do tempo de armazenamento.